

# **Az aktivációs és sejthalál szignálok szabályozása T-sejtekben: a ceramid és az ösztradiol szabályozó hatásai**

doktori értekezés

Készítette:

**Kiss Endre**

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Biológia Doktori Iskola  
Immunológia Program

Programvezető:

**Prof. Dr. Erdei Anna**

tanszékvezető egyetemi tanár

Témavezető:

**Dr. Matkó János**

egyetemi tanár

PhD, DSc



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék  
Budapest, 2009.

# Tartalomjegyzék

<b>1. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Bevezetés.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. A membránraftok és biológiai jelentőségük.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3. A szfingomielin-ceramid ciklus .....</b>	<b>8</b>
1.3.1. A szfingomielinázok.....	9
1.3.2. A ceramidok biofizikai tulajdonságai és a membránszerkezetre gyakorolt hatásai.....	11
1.3.3. A ceramidok másodlagos jelátvivő szerepe és molekuláris célpontjai.....	14
<b>1.4. Az ösztrogén immunmoduláló hatása.....</b>	<b>15</b>
<b>1.5. Az ösztrogén genomiális és gyors, nem genomiális         választ is indukál.....</b>	<b>16</b>
1.5.1. A Mannheim-féle osztályozás .....	17
1.5.2. Feltételezett membrán ösztrogénreceptorok .....	19
<b>2. Célkitűzések .....</b>	<b>21</b>
<b>3. A kísérletek során alkalmazott anyagok és módszerek.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Sejttypusok.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Tápoldatok, pufferek, oldatok.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Reagensek, festékek, ellenanyagok.....</b>	<b>25</b>
<b>3.4. Módszerek .....</b>	<b>28</b>
3.4.1. Lépcsősejt izolálása, T- és B-sejtek szeparálása.....	28
3.4.2. Immunfluoreszcens jelölések, áramlási citometria, konfokális mikroszkópia .....	28
3.4.3. A plazmamembrán-potenciál vizsgálata áramlási citofluoriméterrel .....	30
3.4.4. Az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás vizsgálata .....	31
3.4.5. A kaszpázaktivitás áramlási citometriás vizsgálata.....	32
3.4.6. A mitokondriális membránpotenciál áramlási citometriás vizsgálata.....	32
3.4.7. A DNS-fragmentáció áramlási citometriás vizsgálata.....	33

3.4.8. Sejtstimulálás, sejtlízis, SDS-PAGE gélelektroforézis és Western blot.....	33
<b>4. Eredmények .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Ceramidok szabályozó hatásai a T-sejtek</b>	
<b>    aktiváció/sejthalál egyensúlyára.....</b>	<b>36</b>
4.1.1. A receptorindukált ceramidfelszabadulás detektálása és a ceramid „útja” a T-sejtben.....	37
4.1.2. A ceramidok membránstruktúrára és membránpotenciálra gyakorolt hatásai.....	39
4.1.3. Cav1.2 L-típusú Ca <sup>2+</sup> -csatorna, mint a ceramid egyik lehetséges „célpontja” T-limfocitákon?.....	44
4.1.4. A ceramidszignálok hatása az intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -raktárakra.....	51
4.1.5. A hosszabb időtartamú ceramidszignálok hatása a kaszpázkaszkád és az apoptózis mitokondriális útvonalának aktivációjára, időbeli viszonyaira.....	53
<b>4.2. Mennyire tekinthető általánosnak a ceramid aktivációs Ca<sup>2+</sup>-szignált illetve a sejthalált érintő szabályozó hatása különböző érettségi állapotú és típusú immunsejtekben?.....</b>	<b>56</b>
4.2.1. A ceramidszignálok aktivációs Ca <sup>2+</sup> -szignálra gyakorolt hatása különböző immunsejtekben.....	56
4.2.2. A hosszabb időtartamú, sejthalált indukáló ceramidszignálok hatása különböző immunsejtekre .....	58
<b>4.3. Az ösztrogén T- és B-sejtekre gyakorolt gyors, nem genomiális hatásai .....</b>	<b>60</b>
4.3.1. A klasszikus intracelluláris valamint a membrán ösztrogénreceptorok expressziója T- és B-limfocitákon .....	60
4.3.2. Az ösztrogén intracelluláris Ca <sup>2+</sup> -koncentrációra gyakorolt hatása T- és B-sejteken .....	63
4.3.3. Az ösztrogén Akt- és ERK-foszforilációra gyakorolt hatása T- és B-limfocitákban.....	65
4.3.4. A membrán ösztrogénreceptor és a lipid raftok valamint az intracelluláris ERα receptorok közti kolokalizációs viszonyok kérdése .....	66
<b>5. Az eredmények megvitatása .....</b>	<b>68</b>

Irodalomjegyzék .....	72
Összefoglalás .....	82
Summary .....	83
Köszönetnyilvánítás.....	84
Saját közlemények jegyzéke .....	85



## Rövidítések jegyzéke

AIF	apoptosis-inducing factor
AICD	activation-induced cell death
APC	antigen-presenting cell
BCR	B cell receptor
BSA-FITC	bovine serum albumin-fluorescein-isothiocyanate
CAPK	ceramide-activated protein kinase
CAPP	ceramide-activated protein phosphatase
CD	cluster of differentiation
CER	ceramid
cPLA2	citoszolikus foszfolipáz A2
CRAC	calcium release-activated calcium channel
CTGF	connective tissue growth factor
CTX-B	cholera toxin-B
DAG	diacyl-glycerol
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signalling complex
EBP50	ezrin/ moesin/ radixin binding protein
EDTA	ethylene diamine tetracetic acid
ER	estrogen receptor
ERE	estrogen responsive element
ERK	extracellular signal activated kinase
E2	17 $\beta$ -estradiol
E2-BSA-FITC	17 $\beta$ -estradiol-BSA- fluorescein-isothiocyanate
FADD	Fas-associated death domain-containing protein
FAN	factor associated with neutral sphingomyelinase activation
FasL	Fas ligandum
FBS	fetal bovine serum
FCS	fetal calf serum
FITC	fluorescein-isothiocyanate
GABA	$\gamma$ -amino-butiric-acid
GPI	glycophosphatidylinositol
GPR30	G protein coupled receptor 30
HRP	horse radish peroxidase
Hsp90	heat shock protein 90
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IFN	interferon
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminális kináz
LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MHC	major histocompatibility gene complex
mER	membrane estrogen receptor
MS	multiple sclerosis
NEHRF	Na <sup>+</sup> / H <sup>+</sup> exchanger regulatory factor
NOS	nitrous oxide systems
NSD	neutral sphingomyelinase activation domain

OHT	hidroxitamofene
PC-PLC	phosphocholine-specific phospholipase C
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehid
PI	propidium iodide
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKC	protein kináz C
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RA	rheumatoid arthritis
SDF 1	stromal cell-derived factor 1
SLE	systemic lupus erythematosus
SM	szfingomielin
SMase	sphingomyelinase
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases
SR	steroid receptor
tBid	truncated Bid
T <sub>H</sub>	T helper
TCR	T cell receptor
TNFR	tumor necrosis factor recep
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

# 1. Irodalmi áttekintés

## 1.1. Bevezetés

A T-limfociták tímuszban végbemenő érése során az antigénfelismerésért felelős T-sejt receptor (T cell receptor-TCR) génátrendeződési folyamatainak eredményeként óriási számú, eltérő variábilis doménszerkezettel és specificitással rendelkező receptort hordozó T-sejt jelenik meg. Pozitív majd negatív szelekciós lépések révén a saját fő hisztokompatibilitási génkomplex (Major Histocompatibility gene Complex – MHC) által kódolt membránfehérjék és a hozzájuk kapcsolódó idegen antigénekből származó peptidek felismerésére képes sejtklónok tovább differenciálódhatnak, és végül érett, naiv T-sejtekként a perifériára kerülhetnek. A tímuszt elhagyó, nyugvó állapotú, érett T-limfociták további sorsát a környező sejtek és sejtközötti állomány felől érkező, valamint különböző szolubilis molekulák által közvetített ingerek határozzák meg. A másodlagos nyirokszervekben kiemelkedő jelentőségű a T-sejtek és az általuk felismerhető MHC-peptid komplexeket hordozó antigénbemutató sejtek (Antigen Presenting Cell – APC) találkozása. A T-sejtek antigénspecifikus aktivációja során, a megfelelő kostimulációs és túlélési szignálok jelenlété mellett, a sejtek proliferációval, citokintermeléssel, effektor- és memóriasejtté történő differenciálódással válaszolnak. Kostimulációs- és a sejtek túlélését biztosító jelek hiányában azonban a TCR által kiváltott sejtaktiváció, a stimulus erősségétől függően, funkcionális válaszképtelenség (anergia) kialakulásához illetve programozott sejthalálhoz (apoptózist) is vezethet. Az apoptózis döntő jelentőségű a saját struktúrákat felismerő, autoreaktív limfociták, valamint az immunválasz során funkcionálisan szükségtelenné váló effektor T-limfociták eltávolításában, így az immunológiai tolerancia kialakulásában (1).

Bár a T-sejtek antigénspecifikus aktivációjában elsődlegesen a TCR által az antigénprezentáló sejt MHC molekuláin bemutatott antigénpeptid felismerése és a kapott kostimulációs jelek a meghatározóak, az utóbbi évek kísérletes eredményei egyéb moduláló stimulusok, nevezetesen a különböző *stresszszignálok által aktivált szfingomielin-ceramid jelpálya* illetve a *szteroidhormonok (pl. az ösztrogének)* közvetítette szabályozó hatások szerepére is felhívják a figyelmet (2, 3).

## 1.2. A membránraftok és biológiai jelentőségük

A *membrán raftok* kis méretű (10-200 nm), heterogén, nagyfokú dinamikával jellemezhető, koleszterinben, szfingomielinben, glikoszfingolipidekben valamint GPI-horgonyzott- és zsírsavdalláncal kapcsolt fehérjékben gazdag „membrándomének”, amelyek a sejtműködés különböző membránhoz kapcsolt folyamatait kompartmentalizálják (4,5). A kialakulásukért felelős egyik legfőbb tényező az őket alkotó lipidek sajátos fizikai-kémiai tulajdonságain alapuló ún. laterális fázisszegregáció jelensége (6,7). A kis méretű raftok bizonyos körülmények között stabilizálódhatnak, és protein-protein illetve protein-lipid kölcsönhatások révén nagyobb aggregátumokat, „platformokat” képezhetnek. A *kaveolák* a membrán raftok egy speciális formáját képviselik. Ezek koleszterinkötő kaveolin és flotillin fehérjékben gazdag membránbetűrődések, amelyek elsősorban a fokozott membránon keresztüli anyagtranszportot végző sejtípusokra, mint pl. endotél, epitel, és fagocita sejtek, jellemzőek (8).

Funkcionális szempontból a membrán raftoknak számos alapvető sejtfiziológiai folyamatban tulajdonítanak fontos szerepet: irányítják és szabályozzák a membrántranszport folyamatokat (endo/exocitózis), a sejtfelszíni molekuláris felismerésen alapuló folyamatok révén a sejtadhéziót, patogén baktériumok és vírusok fertőzési mechanizmusát, a sejt migrációt és kemotaxist. Az intracelluláris jelátviteli folyamatokban fontos enzimek, adaptorfehérjék térben és időben ko-ordinált „toborzása” révén kitüntetett szerepet játszanak a különböző sejtfelszíni receptorok által indukált sejtválasz kialakulásában (9-15).

A membránraftok a celluláris és humorális immunválasz, valamint a természetes immunitás sejtjes elemeinek különböző funkcióiban is elengedhetetlen szerepet játszanak. Számos irodalmi adat utal arra, hogy a membrán raftok szabályozó szerepet töltenek be a limfociták érésében, differenciációjában, az antigénprezentációban, a antigénkötő sejtfelszíni receptorok jelátviteli folyamatában, az immunológiai szinapszis kialakulásában, a célsejt közvetlen sejt-sejt kölcsönhatáson alapuló elpusztításában, a hízósejtek allergén által kiváltott aktivációjában (16-20).

Fontos megjegyezni, hogy a raftok szfingolipid- és koleszterintartalmában bekövetkező változások a „toborzott” jelátviteli „molekulakészlet” összetételének megváltozásához, ezen keresztül pedig az érintett sejtek funkcionális tulajdonságainak megváltozásához vezethetnek. Mindezek a sejtműködésnek egy olyan molekuláris

finomszabályozási lehetőséget vetik fel, amelynek kiemelt jelentősége lehet az immunrendszer működése, bizonyos patológiás folyamatok kialakulása, illetve újfajta terápiás eljárások kifejlesztése szempontjából (21-23).

### 1.3. A szfingomielin-ceramid ciklus

A sejtmembránban található glicero-foszfolipidek és bizonyos, az intracelluláris jelátviteli pályákban jól ismert szerepet betöltő anyagcseretermékeik (pl. diacil-glicerol (DAG), inozitol-triszfoszfát ( $IP_3$ )) mellett régóta kérdéses volt, vajon az egyébként szerkezeti szempontból sokkal változatosabb és összetettebb csoportot alkotó *szfingolipidek* is rendelkeznek-e hasonló tulajdonságokkal. Az elmélet bizonyítékaként mára számos kísérletes eredmény utal arra, hogy a sejteket érő bizonyos stimulusok a szfingolipid anyagcserében érintett enzimek, (pl. szfingomielinázok, ceramidázok, ceramid szintáz, szfingozin kináz) stimulálásán keresztül biológiai aktivitású szfingolipidek felszabadulását idézik elő. Ezek a „jelkövetítő” molekulák olyan folyamatok szabályozásában kapnak szerepet, mint az apoptózis, proliferáció, differenciáció, sejtciklus, intracelluláris proteintranszport, gyulladásos folyamatok (24). Az elsőként megismert és azóta legalaposabban dokumentált ún. „*szfingomielin-út*” a szfingomielin (SM) ceramiddá (N-acil-szfingozin) és foszforil-kolinná történő hidrolízist katalizáló szfingomielinázok aktiválódásán alapul. A jelpálya felfedezése jelentősen megváltoztatta az addig pusztán membránszerkezeti alkotóként számon tartott szfingolipidekről illetve a ceramidokról kialakult képet (25-27).

A jelenlegi ismeretek szerint a *ceramid*, mint másodlagos jelkövetítő molekula kulcsszerepet játszik számos extracelluláris ágens által kiváltott intracelluláris jelátviteli folyamatban, amelyek sejttípustól függően *proliferációt*, *differenciációt*, a *sejtciklus leállítását* vagy *sejthalált* idéznek elő. A megfigyelést, miszerint ezekért a biológiai hatásokért a kiváltott ceramidfelszabadulás tehető felelőssé, jól alátámasztja a tény, hogy rövid szénláncú, sejtporéabilis ceramidanalógokkal vagy exogén szfingomielinázkezeléssel, az esetek nagy többségében, ugyanaz a hatás váltható ki, mint az extracelluláris ágens alkalmazásával. Hangsúlyozni kell azonban, hogy bár a szfingomielináz aktiválódása elengedhetetlen ezekben a folyamatokban, az okozott hatás nem feltétlenül a ceramid, hanem adott esetben valamelyik anyagcseretermékének, pl. szfingozin vagy szfingozin-1-foszfát, közvetítésével alakul ki (28).

### 1.3.1 A szfingomielinázok

Az eddig azonosított, a szfingomielin hidrolizisét és így ceramidakkumulációt kiváltó stimulusok többsége elsősorban a sejteket érő különböző *stresszhatásokkal* hozható összefüggésbe: apoptózist indukáló sejthalálreceptor-ligandok (CD95L/FasL, TNF $\alpha$ - (Tumor Necrosis Factor alpha), TRAIL (Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-Inducing Ligand)), gyulladások citokinek (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ), ionizáló- és ultraibolya sugárzás, oxidatív stressz (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO), hő sokk, citotoxikus hatású kemoterápiás vegyületek. Ugyanakkor a szfingomielin-útvonal aktiválódásáról számoltak be bizonyos differenciációt indukáló ágensek és növekedési faktorok (D<sub>3</sub>-vitamin, vérlemezke eredetű növekedési faktor (Platelet-Derived Growth Factor – PDGF), idegi növekedési faktor (Nerve Growth Factor – NGF), progeszteron), számos sejtfelszíni receptor (CD40, CD28, CD5, CD20, LFA-1, L-szelektin, B-sejt receptor (B Cell Receptor–BCR), Fc $\gamma$ RII), valamint bizonyos patogén baktériumok (*Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*), és vírusok (*Rhinoviridae*, *Sindbis* vírus) fertőzőési mechanizmusa kapcsán is (29, 30).

Az emlősökben előforduló *szfingomielinázok* enzimatisuk aktivitásuk pH optimuma alapján savas-, neutrális-, és alkalikus csoportba sorolhatók. Attól függően, hogy kofaktorként igényelnek-e kétértékű kationt, további altípusokat különböztetnek meg. (31).

A Zn<sup>2+</sup>-metalloenzimek közé tartozó *savas szfingomielináz* (acid sphingomyelinase-aSMase) egyetlen gén terméke, amelynek defektusa tehető felelőssé az ún. A- és B-típusú Niemann-Pick betegség kialakulásáért. A génről átíródó prekursor fehérje poszttranszlációs modifikációt követően egy az endo-lizoszómális rendszerbe irányított, valamint egy szekretálódó formát eredményez. A lizoszómális változat pH 5 körüli környezetben aktív, a szekretoros típus viszont semleges pH mellett is működőképes. Knockout egérmodellen valamint sejtkultúrákon végzett vizsgálatok szerint a savas szfingomielináz aktivitása és az okozott ceramidfelszabadulás fontos szerepet játszik a különféle stresszhatásokra adott sejtválaszban. Az azonban egyelőre nem tisztázott, hogy a kétféle enzimforma milyen mértékben vesz részt ebben a funkcióban. A szekretoros savas szfingomielináznak fontos szerepet tulajdonítanak az atheroszklerózis kialakulásában (32).

A *neutrális szfingomielinázok* (nSMase) emlősökben integráns membránfehérjék. Kofaktorként Mg<sup>2+</sup> és Mn<sup>2+</sup> ionokat igényelnek, aktivitásukhoz a pH 7 körüli környezet az optimális. Szöveti előfordulásukat tekintve széleskörű expressziót mutatnak, a legnagyobb aktivitást azonban az agyban azonosították. Három típusukat sikerült idáig klónozni

(nSMase1, -2, -3), amelyek közül az nSMase1 és -2 mutat szekvenciahomológiát a bakteriális szfingomielinázal. Sejten belüli elhelyezkedésüket tekintve az nSMase1 az endoplazmás retikulumban és a Golgi rendszerben, az nSMase2 a Golgiban és a plazmamembránban található. Neutrális szfingomielináz-aktivitásról számoltak be az apoptózis, gyulladásos folyamatok, sejtproliferáció, differenciáció kapcsán, azonban csak kevés olyan adat áll rendelkezésre, amely alapján egyértelműen egy adott enzimmel lehetne társítani ezeket a funkciókat. Az nSMase1 bár *in vitro* körülmények között katalizálja a szfingomielin hidrolízisét, *in vivo* overexpressziós rendszerben ezt nem sikerült igazolni (33). Egy újabb vizsgálat sorozat ugyanakkor összefüggésbe hozta a hősokk által indukált ceramidfelszabadulással és apoptózissal (34). Az nSMase2 aktiválódásáról számoltak be a TNF $\alpha$  és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által indukált apoptózisban. A fehérje overexpressziója a ceramid szint emelkedését váltotta ki oligodendrocyta sejtek raftfrakciójában, valamint fokozta a staurosporin-indukált apoptózist. Az Alzheimer kór kapcsán fontos szerepet tulajdonítanak az nSMase2-nek az amyloid- $\beta$  peptid citotoxikus hatásában. MCF7 adherens sejtvonalon végzett kísérletek szerint az nSMase2-aktivitás összefügg a konfluens állapot kialakulásakor tapasztalható sejt ciklusleállással. Az nSMase2 fokozza a JNK (c-Jun N-terminális kináz) IL-1 $\beta$  által indukált foszforilációját. A nemrégiben előállított nSMase2 knockout egerek csontvázrendszerének fejlődési defektusa az enzim fejlődésbiológiai vonatkozásaira hívta fel a figyelmet.

Az *alkalikus szfingomielináz* (alk-SMase) szekvenciahomológia vizsgálatok alapján a nukleotid pirofoszfátáz/foszfodiészteráz fehérjecsaldába tartozik. Expressziója kizárólag a vékonybél nyálkahártyájában jellemző, ahol plazmamembránhoz kötött és szolubilis formában egyaránt előfordul. Aktivitásához epesók jelenléte szükséges. Szerepe a táplálékkal felvett szfingomielin lebontásában van, ugyanakkor hiánya összefügg a bélrendszer gyulladásos megbetegedéseivel és a vastagbélrák kialakulásával (35).

A szfingomielinázok aktiválódásának molekuláris szabályozásáról elsősorban celluláris stresszfaktorok hatásának vizsgálata szolgáltatott ismereteket (28). A savas szfingomielináz TNF receptor vagy a CD95/Fas által kiváltott aktivációjában a receptor egyik ún. haláldoménjéhez adapter fehérjéken keresztül kapcsolódó és autoproteolízissel aktiválódó kaszpáz 8 enzimet, valamint a receptor aktivációja során a foszfatidil-kolin-specifikus foszfolipáz C enzim által felszabaduló DAG-t tartják fontosnak (36). Limfocitákon megfigyelték, hogy CD95 vagy CD40 molekulán keresztüli stimulálás, valamint UV sugárzás hatására a savas szfingomielináz a citoskeleton aktív

közreműködésével a plazmamembrán külső rétegébe transzlokálódik, és ott lokális ceramidfelszabadulást idéz elő a lipid raftokban (37-39). A jelenség további vizsgálata alapján a szfingomielináz transzlokációjáért a protein kináz C $\delta$  (PKC $\delta$ ) enzim tehető felelőssé, amely aktivációt követően az endo-lizoszómális rendszerbe kerülve szelektíven foszforilálja a lizoszómális savas szfingomielináz Ser<sup>508</sup> aminosavmaradékát. Ez a foszforilációs lépés nélkülözhetetlen a szfingomielináz aktivációjában és a plazmamembránba történő transzlokálódásában (40). A savas szfingomielináz PKC $\delta$  általi szabályozása további megerősítést nyert az UV fény által kiváltott apoptózis folyamatában is (41).

A neutrális szfingomielinázzal kapcsolatban a TNF receptor és a CD40 intracelluláris szakaszán azonosítottak egy jellegzetes motívumot (neutral sphingomyelinase activation domain-NSD), amely a FAN (factor associated with neutral sphingomyelinase activation) adapter fehérjével kialakított kölcsönhatása révén indukálja a neutrális szfingomielináz aktiválódását (42, 43). Számos kísérlet eredménye utal az oxidatív stressz és a neutrális szfingomielináz kapcsolatára (44, 45). A glutation (GSH), a sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló tiol-csoportot hordozó molekula, antioxidánsként kritikus szerepet tölt be az emlős sejtek oxidatív stressz elleni védekezésében. Nemrégiben a GSH-t, mint a neutrális szfingomielináz hatásos inhibitorát írták le. A TNF receptoron keresztül stimulációkor a citoszolikus foszfolipáz A2 (cPLA2) fokozza a reaktív oxigén intermedierek (reactive oxygen species-ROS) termelődését, amely hatására a sejtben belüli GSH szint lecsökken, ez pedig a neutrális szfingomielináz aktivációját váltja ki (46, 47). Egy másik vizsgálatban a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által kiváltott oxidatív stressz során a neutrális szfingomielináz plazmamembránba történő transzlokációját figyelték meg, így megállapítható, hogy az enzim intracelluláris lokalizációját a sejt aktuális redox állapota dinamikus módon képes szabályozni (48).

### **1.3.2. A ceramidok biofizikai tulajdonságai és a membránszerkezetre gyakorolt hatásai**

Szerkezeti szempontból a ceramidok (N-acil-szfingozin) a szfingozinból és annak aminocsoportjához amidkötéssel kapcsolódó, változó hosszúságú és telítettségű zsírsavláncból épülnek fel. A természetben előforduló ceramidok zsírsavláncának szénatomszáma 2 és 28 között változik, emlőssejtekben a legjellemzőbb a C<sub>16</sub> és C<sub>24</sub>-es forma. A ceramidok a legkevésbé poláros, leginkább hidrofób tulajdonságú természetes



lipidek közé tartoznak. A mesterséges foszfolipidmembránokon végzett vizsgálatok rámutattak, hogy a ceramidok sokrétű sejtbiológiai hatásainak hátterében sok esetben a ceramidok egyedi biofizikai tulajdonságai állhatnak. A ceramidok legfontosabb membránszerkezetre gyakorolt hatásai közé tartozik a foszfolipidek molekuláris rendezettségének fokozása, a laterális fáziselkülönülés és doménképzés, nem lamelláris fázisú membránrégiók kialakítása és a membrángörbület szabályozása, az ún. flip-flop lipidmozgások elősegítése, a membránpermeabilitás fokozása (49-51).

A ceramidmolekulában található amidkötés és a szfingozinrész hidroxilcsoportjai által kialakított, hidrogén-donorként és akzeptorként egyaránt működő, kisméretű poláros fejcsoport, valamint a hosszú telített zsírsavlánc kedvez a kiterjedt hidrogénkötés-rendszer és van der Waals kölcsönhatások kialakulásának ezen molekulák között. A molekulák közti erős kölcsönhatás és a nagyfokú öngaggregálódási hajlam eredménye a *lipid zsírsavláncok rendezettségi fokának növekedése* és a *laterális fázisszegregálódás* a kettős foszfolipidrétegben (52).

A szfingomielináz aktiválódása jelentős változásokat indukál a koleszterol sejten belüli homeosztázisában, annak a sejtfelszínről intracelluláris membránokba történő transzlokációját váltja ki. Míg a szfingomielin szfingozin része rendkívül erős hidrogénkötést létesít a koleszterol hidroxilcsoportjával, addig a ceramid csak gyenge kölcsönhatást mutat a koleszterollal. A ceramid és a szfingomielin közti kedvező molekuláris kölcsönhatások eredményeképpen a ceramid előszeretettel dúsul fel a szfingomielinben gazdag membrándoménekben, amelyeknek így megnövekedett stabilitás biztosít. Ugyanakkor a koleszterolhoz való kis affinitása miatt a ceramid a koleszterolgazdag membránrégióktól elkülönülő doméneket alakít ki. Modellmembránokon végzett vizsgálatok szerint a ceramid *kompetálni képes a koleszterollal* a szfingomielinnel való kölcsönhatás kialakításáért, amelynek eredményeképpen a szfingomielin hidrolízisekor felszabaduló ceramidmolekulák, valószínűleg egy termodinamikailag kedvezőbb állapot elérése érdekében, „lecserélik” a koleszterolt a szfingomielinben gazdag membrándoménekben (53-55).

A ceramid fentebb említett tulajdonságai és rendkívüli hidrofóbicitása következtében a szfingomielin hidrolízisét és így gyors ceramidakkumulációt kiváltó stimulusok tehát gél- illetve rendezett folyadékállapottal jellemezhető, *ceramidban gazdag membránmikrodomének* képződését eredményezik (56-58). A ceramidban gazdag membrán mikrodomének ugyanakkor spontán fúzió révén nagyobb méretű, akár 5 µm átmérőjű ún. „*makrodoméneket vagy platformokat*” képesek kialakítani. Ceramidban

gazdag membrándomének képződéséről számoltak be a CD95, CD40, TRAIL, Fc $\gamma$ RII, CD14 receptorok stimulációját követően, különböző patogén baktériumok, vírusok (*Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, Rhinovírus) fertőzése kapcsán,  $\gamma$ - és UV sugárzás továbbá citotoxikus szerek (cysplatin) hatására (59, 60). A ceramidban gazdag mikrodomének funkcionális szerepével kapcsolatban a legtöbb eredmény a TNF receptor családba tartozó CD95 molekula kapcsán született. A CD95 molekulák ligandum általi stimulációját követően az intracelluláris vezikulákban elhelyezkedő savas szfingomielináz aktiválódik, transzlokálódik a plazmamembrán extracelluláris oldalára, majd a szfingomielin hidrolízisével ceramidban gazdag membránplatformok képződését indukálja. A kialakuló raftaggregátumok egyfajta jelerősítő funkciót betöltve biztosítják a hatékony jelátvitelhez szükséges lokális receptordenzitást: elősegítik a CD95 molekulák magasabb fokú oligomerizációját valamint a FADD (Fas-associated death domain-containing protein) adaptorfehérje és a prokaspáz-8 molekulák toborzása révén az intracelluláris jelátvitelt elindító, sejthalált indukáló szignálkomplex (death-inducing signalling complex-DISC) kialakulását (61-63). A stimulált CD95 molekulák membránban megfigyelt átrendeződésében illetve a membránraftokkal való asszociációjában fontos szerepet kap még a receptor ezrin molekulán keresztüli kapcsolata az aktin citoskeletonnal és bizonyos raft gangliozidokkal, illetve a kaspáz-8 és a raftmarker GM1 és GM3 gangliozidok között kialakuló kölcsönhatás (64-66).

Fiziológiai szempontból a ceramidnak egy további fontos membránszerkezetre gyakorolt hatása, hogy befolyásolni képes a membránok átjárhatóságát más molekulák számára. Mesterséges membránokon végzett mérések szerint a ceramidmolekulák speciális transzmembrán elrendeződése csatornaszerű struktúrák kialakulását eredményezi. A kialakuló pórusok méretét jelentősen befolyásolja a ceramidmolekulák lokális koncentrációja, közelítő számítások szerint akár a néhányszor 10 nm-es átmérőt is elérhetik (67-70). Siskind és munkatársai a vizsgálatokat kiterjesztették izolált mitokondriumokra is, amelyek alapján a fiziológiás koncentrációtartományban alkalmazott ceramidkezelés hatására a mitokondrium külső membránja 20-60 kDa mérettartományig átjárhatóvá válik kisebb molekulák, pl. az apoptózis mitokondriális útvonalában fontos citokróm-c számára (71, 72). In vivo, az apoptózisnak ez formája a mitokondrium külső membránjában pórusok képződésével jár, amelyet többek között a Bcl-2 fehérjecsalád proapoptotikus tagjai (pl. Bax, Bak, tBid-truncated Bid) valamint a GD3 gangliozid mitokondriális feldúsulása indukál. A mitokondrium permeabilizálódása együtt jár a mitokondrium

membránpotenciáljának csökkenésével, a légzési elektrontranszportlánc szétkapcsolódásával, reaktív oxigéngyökök felszabadulásával, valamint az ún. effektor kaszpázok (kaspáz-3,-6,-7) aktivációját előidéző molekulák (citokróm-c, SMAC/Diablo (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases), AIF (Apoptosis-Inducing Factor)) felszabadulásával. Ezen mitokondriális változások hatékony kivédésében a Bcl-2 család anti-apoptotikus tagjai (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) játszanak fontos szerepet a mitokondriális membrán integritásának fenntartásával (73-75). Tekintve, hogy a mitokondriumban megtalálhatóak a ceramidbioszintézis enzimei, valamint hogy a CD95, TNFR vagy UV sugárzás által indukált apoptózis során a mitokondriumok ceramidtartalmában két-háromszoros növekedés tapasztalható, valószínűsíthető a ceramid által képzett csatornák szerepe a mitokondrium apoptózis során lejátszódó permeabilizálódásában (76).

A fenti jelenségek alapján összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a ceramidakkumuláció által indukált, a membránok fizikai tulajdonságaiban (pl. a lipidek rendezettsége) bekövetkező változások befolyásolhatják bizonyos membránban lokalizált enzimek, ionszorongók működését. A ceramid membránraftokban történő feldúsulása és az ezzel párhuzamosan zajló „koleszterol efflux” szelektíven befolyásolhatja bizonyos fehérjék raftasszociáltságát, különösen pl. a koleszterolkötő fehérjékét (77, 78); a membrán permeabilizálása révén lokális változások léphetnek fel az ionkoncentrációkban, amelyek kihatnak bizonyos molekuláris kölcsönhatásokra a membrán citoszól felőli oldalán; szolubilis enzimek átmenetileg a membránhoz kapcsolódhatnak és így jelátviteli funkcióval rendelkező lipideket köthetnek meg; lipid transzfer proteinek (pl. a nemrégiben felfedezett ceramid transzfer protein-CERT, (79)) a membrántól távol elhelyezkedő célmolekulákhoz szállíthatják a túlságosan hidrofób lipideket.

### **1.3.3. A ceramidok másodlagos jelátvivő szerepe és molekuláris „célpontjai”**

A ceramidmolekulák nagyfokú hidrofóbicitásuk miatt jellemzően membránhoz kötött állapotban maradnak a képződésüket követően is, így valószínűsíthető, hogy a kiváltott biológiai hatást jelentősen meghatározza a ceramidképződés intracelluláris helye. *In vivo* a ceramid származhat a szfingomielin hidroliziséből valamint *de novo* szintézisből is. A legtöbb esetben a képződő ceramid apoptózist vagy a sejtciklus leállítását eredményezi. Ugyanakkor glikoziláció hatására a molekula inaktíválódhat is, valamint bizonyos anyagcsereútvonalakon keresztül más, akár vele ellentétes biológiai hatást közvetítő szfingolipiddé, pl. szfingozin-1-foszfáttá is alakulhat. A ceramid sokrétű, sejtípustól függő

sejtbíológiai hatásait valószínűleg a képződéséhez vezető anyagcsereútvonalak változatossága magyarázza. Az eddigi vizsgálatok számos, a stresszindukált jelátviteli kaszkádban szerepet játszó protein kinázt és foszfatázt azonosítottak, mint a ceramid közvetlen vagy közvetett célmolekulái. A KSR-t (kinase suppressor of Ras), mint ceramid által aktivált protein kinázt (CAPK) írták le, amely a Raf-1 molekulán keresztül aktiválni képes az ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) MAPK (mitogén aktivált protein kináz) útvonalat. A Raf-1-ről ugyanakkor kiderült, hogy a BAD molekulán keresztül a ceramid által indukált apoptózisban is szerepe van. A ceramid a protein kináz C zéta izoformájának (PKC $\zeta$ ) aktiválásával pozitívan szabályozza a stresszaktivált protein kináz/c-Jun N-terminális kináz (SAPK/JNK) kaszkádot, ugyanakkor negatívan hat a túlélési szignálokat közvetítő protein kináz B (PKB/Akt) molekulára. Utóbbi folyamatban szerepet kapnak szerin-treonin protein foszfatáz PP2A és PP1 családba tartozó ceramid által aktivált proteinfoszfatázok (CAPP) is. A PP2A defoszforiláció révén elősegíti a Bax fehérje proapoptotikus funkcióját, ugyanakkor negatívan hat a Bcl-2 kinázként működő PKC $\alpha$ -ra, valamint közvetlenül defoszforilálni képes magát a Bcl-2-t is, amelynek ezáltal gátolja az anti-apoptotikus hatását. A retinoblasztoma (Rb) fehérje defoszforilálásával a PP1 a sejtciklus leállítását váltja ki. A CAPP fehérjék apoptózis során pozitívan szabályozzák az effektor kaszpázok működését. A RAX molekulán keresztül a ceramid aktiválni képes a duplaszálú RNS-függő protein kinázt (PKR), amely a proteinszintézis bizonyos faktorainak működését gátolja. A ceramid a lizoszómális katepszin D proteáz autokatalikus proteolízisét váltja ki. A katepszin D szerepét igazolták az apoptózisban, a normál fiziológiás proteinlebontásban, bioaktív proteinek képződésében és a fehérjeantigének intracelluláris feldolgozásában (47, 80-82). A ceramid kapcsán beszámoltak bizonyos ioncsatornák funkciójának szabályozásáról is, így az aktivációs kalciumszignál kialakulásában fontos CRAC (calcium release-activated calcium channel) csatornák inaktiválásáról, a feszültségfüggő K<sup>+</sup> (K<sub>v</sub>1.3) csatornákra gyakorolt gátló hatásról (83-85).

#### **1.4. Az ösztrogén immunmoduláló hatása**

Egyes autoimmun betegségek jelentős nemek közötti megoszlásbeli különbséget mutatnak. Ilyen például a szklerózis multiplex (multiple sclerosis-MS), szisztémás lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthritis (RA), myasthenia gravis; inzulin-függő diabetesz

mellitusz (IDDM); ahol az érintettek 75-80%-a nő (86). Többek között ez hívta fel a figyelmet az ösztrogén (17 $\beta$ -ösztradiol, röviden E2) immunrendszerre gyakorolt esetleges hatására is.

Az eddigi eredmények azt mutatták, hogy bizonyos immunológiai folyamatok eltérnek a két nem között, egereknél kimutatták, hogy immunizálás után a nőstényeknél erőteljesebb az ellenanyag termelés és a T sejt aktiváció, mint hímeknél (86). Bizonyított, hogy a nőknél magasabb a CD4<sup>+</sup> sejtpopuláció aránya, ami magyarázhatja a náluk fellépő fokozottabb immunválaszt. (86,87). A legszembetűnőbb különbséget terhes nőknél jegyezték fel, ebben az időszakban az ösztrogén mennyisége jelentősen megemelkedik. Az MS, és RA tünetei csökkentek a terhesség során, míg szülés után visszaesés volt tapasztalható a betegek állapotában. Ezzel ellentétben az SLE tünetei romlottak vagy nem változtak ebben az időintervallumban (86).

Azoknál a nőknél, akiknél a posztmenopauzális tüneteket hormonpótló terápiával kezelték; csökkent a T-sejt szám; míg a B sejteké növekedett, vagy nem változott. Az mindezekből kitűnik, hogy az ösztrogén aktuális mennyisége hatással van az immunrendszerre, és befolyásolja az immunválasz kimenetelét, de a részletek még korántsem tisztázottak.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai is az E2 immunmoduláló hatását támasztották alá. Ovaryektomizált és kontroll álműtött egereken különböző immunizálási sémákat alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy az ösztrogén fokozza a T-sejt függő immunválaszt, míg a T-sejt függetlenre nincs hatással.

### **1.5. Az ösztrogén genomiális és gyors, nem-genomiális választ is indukál**

Ma már elfogadott tény, hogy számos sejttípusnál az ösztrogén a hagyományos úton kívül nem-genomiálisan is hathat.

Klasszikusan a szteroid hormon receptorok (SR) egyben transzkripció faktorok, is melyek a célgén expresszióját szabályozzák. A hormon a receptorhoz kötődve konformáció változást idéz elő, ami a citoplazmatikus chaperon fehérjétől (Pl. Hsp90) való elkülönülést és a magi lokalizációhoz szükséges szekvenciák megjelenését eredményezi. Az SR specifikusan ismeri fel a nukleotid szekvenciát, a célgén promoterén található szteroid kötő válaszelemhez kapcsolódva, kiváltja ezáltal a génexpresszió változását (88).

A szteroid receptorok három fő funkcionális doménből állnak:

1. variábilis N terminális domén, ami a transzaktivációt szabályozza;
2. egy cisztein gazdag régió, ami a DNS-hez kötődésért felelős és szabályozza a specifikus hormonhatást;
3. C terminális domén, ami a hormont köti és a sejtmagi transzlokációt irányítja; valamint a dimerizációért és a Hsp kötéseért is felelős (88).

A klasszikus úttal szemben a nem-genomiális úton másodperceken-perceken belül bekövetkező jelátviteli és fiziológias változások figyelhetők meg a sejtben, melyek túl gyorsak ahhoz, hogy fehérje szintézisen keresztül szabályozottak legyenek, és a transzkripció és transláció inhibitorok nem gátolják ezen folyamatokat (89, 90). A gyors hatások plazmamembrán receptort feltételeznek, vagy legalábbis membránasszociáltat. A hagyományos, genomiális út a célsejt komplex funkcióját szabályozza; míg a nem-genomiális út lehetőséget adhat a dinamikus környezeti változáshoz való alkalmazkodáshoz és a szabályozás módosításához/ pontosításához .

Ösztrogén hatására számos jelátviteli kaszkád indul el, mint például: MAPK/ERK aktiváció; foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K)/AKT útvonal; ion csatornák nyitása; G-fehérjéhez kapcsolható másodlagos hírvivők (cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$ ) felszaporodása; növekedési faktor receptorok stimulálása. Mivel az ösztrogén receptornak (ER) nincs saját kináz aktivitása, ezért szignoszómát alkot, melyekben G-fehérjék; hősokk proteinek; caveolin-1; mátrix metalloproteinázok; c-Src találhatók (90, 91, 92).

### **1.5.1. A Mannheim-féle osztályozás**

Az ellentmondásos és sokféle adat alapján valószínűsíthető, hogy a nem-genomiális hatások szövet és sejt típusonként jelentősen eltérőek lehetnek, ezért 1998-ban Mannheimben összehívták az első szteroid hormonok gyors hatásairól szóló nemzetközi találkozót; ahol rendszereztek az általuk kiváltott nem-genomiális válaszokat.

Két fő csoportot hoztak létre aszerint, hogy egyedül, vagy valamilyen agonista partnerrel együtt váltja ki a gyors választ. Mindkét csoporton belül lehet specifikus és nem specifikus kategória, az alapján, hogy receptoron keresztül történik a hatás vagy sem (93).

### Klasszikus intracelluláris receptor

A klasszikus szteroid receptorok nemcsak genomiális, hanem nem-genomiálisan hatásokat is képesek közvetíteni, a gyors válaszokat a klasszikus receptor antagonistájával gátolni tudták.

Számos szövetnél, sejttípusnál tapasztalt eredmények azt mutatják, hogy az ösztrogénnek szerzteágazó hatásai lehetnek, melyben feltehetően több receptor is szerepet játszik:

GH3/ B6 patkány hipofízis tumor sejteinek plazmamembránja ER epitópra specifikus ellenanyaggal pozitív jelölődést mutatott. Ezeket a sejteket  $17\beta$ -ösztradiol nanomoláris koncentrációjával kezelve gyors prolaktin felszabadulást tapasztaltak. Birka magzati tüdő artéria endotél sejtekben  $17\beta$ -ösztradiol hatására 5 percen belül NOS aktivitás volt megfigyelhető, amit a tamoxifén (ER antagonistá) gátolni tudott. Nyúl uterusban is leírtak a klasszikus ER- ral rokon szerkezetű ösztrogénköötő fehérjét.

Olyan esetben is megfigyeltek nem-genomiális választ, amikor az adott sejtől, szövetből hiányzott a klasszikus szteroid receptor (knock out állatok); illetve számos példa van arra is, amikor a klasszikus receptor antagonistái nem gátolnak bizonyos ösztrogénnek tulajdonítható sejtválaszt (93).

Az agyban és a központi idegrendszerben számos szteroid által kiváltott hatás nem a klasszikus receptoron, hanem ionfüggő neurotranszmitter receptorokon keresztül szabályozott.

### Nem receptoron keresztül, direkt nem-genomiális hatás

A gyors hatások direkt szteroid-membrán interakciók eredményeként is bekövetkezhetnek, megváltoztatva a membrán fiziko-kémiai tulajdonságait.

Willmer már 1961-ben felvetette, hogy a szteroidok beépülhetnek a sejtmembránok lipid kettősrétegébe, így befolyásolva annak fluiditását. Azóta már számos szövetben és sejtben igazolták, hogy a progeszteron és az ösztrogén mikromoláris koncentrációjának hatása van a membránfluiditásra. Azonban ezeket a nem specifikus szteroid hatásokat fiziológiásnál magasabb koncentrációknál tapasztalták, így az *in vivo* jelentőségük kérdéses (93). Azt azonban mindenképpen meg kell jegyeznünk, hogy a membránreceptor-ligandum kölcsönhatás is gyakran befolyásolja a membrán fluiditását.

### 1.5.2 Feltételezett membrán ösztrogén receptorok

Az még kérdéses, hogy a citoszolikus/magi (ER $\alpha/\beta$ ) és a membrán ösztrogén receptor megegyezik-e, vagy létezik valamilyen más fehérje, amely a membránban köti az ösztrogént. Limfocitákkal kapcsolatban még nincsenek ezt igazoló eredmények, más területeken pedig igen ellentmondásos adatok születtek.

A legtöbb tanulmány E2 kötő membrán receptornak a klasszikus ER-t ill. annak valamilyen módosult formáját feltételezi (palmitoilált, foszforilált), ami a módosulás miatt képes nem-genomiális szinten hatni ill. a megnövekedett hidrofobicitás miatt a plazmamembránban elhelyezkedni (93, 90, 94, 95).

Norman és mtsai. indítványozták az úgynevezett „több kötőhelyes receptor” (receptor ensemble) modellt, ennek segítségével magyarázták hogyan tud ugyanaz szteroid receptor egyszerre genomiális és nem-genomiális úton is hatni. A modell szerint a receptornak két különböző ligandumkötő zsebe van, és attól függően, hogy melyikbe illeszkedik a szteroid, aktiválódhat a két különböző útvonal. Amikor membrán caveola-, vagy pályvázó (scaffolding) fehérjékhez kapcsolódik a szteroid receptor - membrán asszociált forma-, akkor a molekulák közötti kölcsönhatásnak köszönhetően konformációja a ligandum alternatív zsebbe való illeszkedésének kedvez. Az alternatív zseb valószínűleg nem hozzáférhető, amikor a citoplazmában van az SR.

Születtek eredmények endothél és emlődagamos sejtekről, melyek arra utalnak, hogy a klasszikus ösztrogén receptor  $\alpha$  és  $\beta$  altípusa caveolához kapcsoltn is megtalálható; habár azt nem tudták teljes bizonyossággal megállapítani, hogy az valóban a magi receptor pontos mása. (90). Az sem teljesen tisztázott, hogy a caveola mely oldalán helyezkedik el a receptor; noha elméletileg lehetne kívül, nem tudni milyen sejtes mechanizmus szükséges a membránon való átmozgatásához. További lehetséges változatok, amikor adaptor/ scaffold fehérjével heterodimert alkot a klasszikus receptor a caveolában; vagy a palmitoilált receptor kötődik a membránhoz.

A szteroid kötő szerepet G fehérjéhez kapcsolt receptor is betöltheti, melynek ligand kötő domainje az extracelluláris oldalon van és a 7 transzmembrán régiót követő intracelluláris részéhez tud kötődni a G $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma$  alegység. Ilyen típusra a publikációk nagy része a GPR30-at említi, mint alternatív ösztrogén receptort, ami intracellulárisan helyezkedik el, és a membrán közelében köti az azon átjutott E2-t (92).

Endotél sejteken végzett vizsgálatok szerint viszont mindenképpen szükséges a klasszikus ER jelenléte, hogy az E2 gyors választ váltson ki; ugyanis csak GPR30-at



expresszáló sejteken nem, de ER $\alpha$  és ER $\beta$  pozitívakon tapasztaltak cAMP, ERK, PI3K aktivációt. De nem zárták ki annak lehetőségét, hogy létezik olyan E2 kötő fehérje, ami az ER-ral homológ építőtípust hordozhat (96).

Egyes kutatási területeken komoly fiziológiás és patológias jelentőséget tulajdonítanak a GPR30-nak. Például ER negatív humán emlőrák sejteken vizsgálták az E2 ill. az OHT (hidroxitamofén) hatását, mely az ER számára antagonistá, de GPR30-nak agonistája. Az ösztrogén a CTGF (connective tissue growth factor) génjét aktiválta a legerősebben, amely nemcsak a proliferációt, hanem a GPR30 indukálta migrációt is elősegíti. Ez magyarázattal szolgálhat arra, hogy miért válaszol az emlő tumor olyan agresszíven az endogén ösztrogén bevitelre, ill. az OHT-re endokrin terápiák során (97).

Idegtdományi vizsgálatok is említést tesznek a GPR30-ról. Főemlősök LHRH (luteinizáló hormon releasing hormon) neuronjának intracelluláris kalcium oszcillációjára mind az E2, mind a membrán impermeábilis E2-BSA hasonló hatással volt. A GPR30-at feltételezik membrán receptornak, mert az ER antagonistája sem az LHRH felszabadulását, sem az intracelluláris kalcium oszcillálását nem blokkolta; ellenben a GPR30 agonistája hasonló oszcillációbeli változást eredményezett, mint az E2 kezelés(98, 99). GPR30 elleni érv: patkány hippocampus elekton mikroszkópos vizsgálat kimutatta, hogy főként a Golgi apparátusban és részben az endoplazmatikus retikulumban található, sejtfelszínen viszont egyáltalán nem. Valamint expressziós szintje nagyjából megegyezett nemtől és kortól függetlenül az állatokban. (100). Hasonló következtetésre jutott egy másik munkacsoport is, mely szerint: az ER  $\alpha$  és  $\beta$  altípusa és a GPR30 határozottan nem egyezik meg a mER-ral (101).

GPR30/- és vad típusú egereket vizsgálva az *in vivo* eredmények azt mutatták, hogy a legtöbb jól ismert ösztrogén által meghatározott paraméterhez (csont tömeg, méh és tímusz súlya, zsír tömeg) nem kell a GPR30; viszont a csont hosszirányú növekedésénél a normális, növekedési lemezre kifejtett E2 hatáshoz kell a GPR30 is (102).

Ezeket kívül elképzelhető hogy más membránban monomer vagy heterodimer formában jelenlévő, esetleg saját kináz aktivitással is rendelkező fehérje az, amely ösztrogénkötő doménnel rendelkezik. Például a HEK 293, humán embrionális vese sejtvonal maxi-K<sup>+</sup> ioncsatornája is mutatott ösztrogén-kötő képességet, ahol a 17 $\alpha$  és  $\beta$  ösztradiol hatására különböző mértékben, de lecsökkent a csatorna expressziója; ami proteoszómális degradációt gátló szerrel megakadályozható volt (103).

## 2. Célkitűzések

A T-sejtek antigénspecifikus aktivációja során a stimulus erősségének függvényében a sejtek proliferációval, citokintermeléssel (effektor funkció) válaszolnak, vagy túl erős inger esetén aktivációindukált sejthalál (AICD) révén elpusztulnak. Bár a folyamatban elsődlegesen a T-sejt antigénkötő receptora által az antigénprezentáló sejt (APC) MHC (major histocompatibility complex) molekuláin bemutatott antigénpeptid felismerése és a kapott kostimulációs jelek a meghatározók, nem hagyható figyelmen kívül más moduláló stimulusok, nevezetesen a különböző *stresszszignálok által aktivált szfingomielin-ceramid jelpálya* illetve bizonyos *hormonális hatások* szerepe sem, amelyek dinamikus „felülszabályozó” szerepet tölthetnek be a T-sejtek „sorsát” illetően.

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint a T-sejtek sorsa a membránban lokálisan akkumulálódott ceramid mennyiségétől igen érzékenyen függ. Egy bizonyos 'küszöbkoncentráció' ( $\sim\mu\text{M}$ ) felett a T-limfociták apoptózissal válaszolnak, míg az alatti membránceramid-mennyiség nem vált ki szignifikáns sejthalált. Megfigyeléseink szerint az apoptózist nem indukáló ceramidszignálok ugyanakkor negatívan befolyásolják a T-sejtek antigénspecifikus aktivációjának folyamatát, a jelátvitel több szintjén is (104). Tekintve a ceramid eddig leírt sokrétű, lipidmembránokra gyakorolt biofizikai valamint funkcionális sejtlejtetani hatásait, pontos hatásmechanizmusának illetve molekuláris célpontjainak megismerése egyaránt kritikus kérdés a T-sejtek, és általánosságban véve az immunrendszer más sejtjeinek homeosztázisában betöltött szerepére vonatkozólag.

A fentiek alapján, munkánk alapvető célkitűzései illetve vizsgált kérdései a következők voltak:

- A ceramid sejtlejtetani- (plazmamembrán potenciál) illetve membránállapotra (mikrodoménszerkezet, -eloszlás) gyakorolt közvetlen hatásainak vizsgálata T-sejteken.
- A T-sejtek antigénspecifikus aktivációját negatívan szabályozó ceramidszignálok hatásmechanizmusának vizsgálata, különös tekintettel az aktivációs kalcium szignálra, valamint újabb molekuláris célpontok azonosítása. A ceramidszenzitív és T-sejt aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálban érintett ioncsatorna fehérjék azonosítása.
- A membránceramid-akkumuláció és az apoptózis kaszpázfüggő mitokondriális útvonalának kapcsolata, időbeli összefüggéseinek vizsgálata.

- Mennyire tekinthető általános érvényű szabályozási mechanizmusnak a ceramidok antigénindukált aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált gátló valamint apoptózist indukáló hatása különböző érettségi- illetve differenciáltsági állapotú immunsejteken (B- és T-limfociták, bazofil leukociták (hízósejtek)?)

Ismert tény, hogy az ösztrogének alapvető szerepet játszanak a hypothalamus, az ivarmirigyek (gonádok) és az agyalapi mirigy működésének szabályozásában. Ezen túl, az ösztrogének, mint pleiotróp hatású hormonok, jelentős védelmi szerepet töltenek be a központi idegrendszerben, elsősorban a neurodegeneratív kórképek vonatkozásában. Ugyanakkor az ösztrogének egyéb perifériás hatásai, többek között az adaptív immunrendszer (B- és T-limfociták) működésére gyakorolt hatások, bár ismertek, korántsem feltártak. Feltételezhető többek között, hogy számos autoimmun betegség esetén a kritikus gének transzkripciószabályozása nemi hormonok által szabályozott. Az ösztrogénhatás egyik megnyilvánulása a neurodegeneratív megbetegedésekkel szembeni védő hatás valamint a bizonyos autoimmun kórképek esetében (pl. SLE) megfigyelt érzékenyítő hatás, amely feltehetően a limfociták aktivációs küszöbének modulálásán keresztül valósulhat meg. Az ösztradiol hormon gyors, „nem genomiális” hatásainak mechanizmusa limfocitákon egyelőre nem tisztázott.

Így az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- Expresszálódnak-e és hol lokalizálódnak az intracelluláris ösztrogén receptor  $\alpha$  és  $\beta$  altípusai T-sejteken?
- Vannak-e az ösztradiolnak specifikus, gyors (nem genomiális) közvetlen hatásai limfocitákra, pl. a  $\text{Ca}^{2+}$ -homeosztázis és a proteinfoszforilációs mintázat tekintetében?

### 3. A kísérletek során alkalmazott anyagok és módszerek

#### 3.1. Sejttypusok

- **IP12-7** egér T<sub>H</sub>-hibridóma sejtvonala: humán influenza vírus (A/PR/8/34 – H1N1 szubtypus) hemagglutinin (HA) fehérje HA1-alegysége C-terminálisának 317-329 aminosavrégióját tartalmazó szintetikus peptiddel (HA<sub>317-329</sub>) előimmunizált, majd az A/PR/8/34 vírussal fertőzött BALB/c egerből kifejlesztett, effektor/memória fenotípussal jellemezhető CD4<sup>+</sup> T-sejt-vonal. A hibridóma a VTGLRNIPSIQSR szekvenciájú szintetikus peptid I-E<sup>d</sup> MHCII molekulával alkotott komplexét felismerő TCR-rel rendelkezik. (A HA<sub>317-329</sub> peptid szintézise szilárd fázisú tBoc módszerrel, tisztítása nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) történt (tisztaság >96%), aminosav-analízissel és tömegspektroszkópiával jellemezve. M=1439 g/mol)
- **Jurkat** humán T-limfóma (ATCC TIB152)
- **JCam Jurkat** Lck-deficiens humán T-limfóma
- **2PK3** immortalizált BALB/c eger eredetű B-sejt-limfóma vonal (ATCC TIB 203, I-E<sup>d</sup>/Eα<sup>d</sup>Aβ<sup>d</sup>), mint antigénprezentáló sejt
- **A20** eger eredetű, érett fenotípusú B-limfóma (ATCC TIB208)
- **X16C** eger eredetű marginális zóna fenotípussal jellemezhető B-limfóma
- **38C-13** eger eredetű éretlen fenotípusú B-limfóma
- **ST486** Burkitt-limfóma eredetű, érett fenotípussal jellemezhető humán B-sejtvonala
- **BL41** Burkitt-limfóma eredetű, érett fenotípussal jellemezhető humán B-sejtvonala
- **RBL-2H3** patkány eredetű bazofil leukémia sejtvonala, mukóza típusú hízósejt fenotípus
- **6-8 hetes nőtény C57BL6/J egerekből izolált lép eredetű B- és T-sejtek**
- A T- és B-sejteket komplett RPMI tápoldatban, míg az RBL-2H3 sejteket 5% FCS tartalmú DMEM médiumban, 37 °C-on, CO<sub>2</sub>-termosztátban tenyésztették.
- Az ösztrogénnel végzett kísérleteket megelőzően a sejtvonalatokat 1 napig fenolvörösmentes, 5% szteroidmentes magzati borjúsérumot tartalmazó RPMI tápoldatban inkubáltuk.

### 3.2. Tápoldatok, pufferek, oldatok:

- **komplett RPMI tápfolyadék:** RPMI 1640 2 mM L-glutaminnal, 2 mM Na-piruváttal, 50  $\mu$ M 2-merkaptóetanollal, antibiotikumokkal, 5% (egér eredetű sejtekhez) illetve 10% (BL41, Jurkat) vagy 20% (ST486) magzati borjúsérummal (Fetal Calf Serum–FCS) kiegészítve
- **szérummentes RPMI tápfolyadék:** RPMI 1640 2 mM L-glutaminnal, 2 mM Na-piruváttal, 50  $\mu$ M 2-merkaptóetanollal, antibiotikumokkal kiegészítve, fenolvörös nélkül
- **DMEM tápfolyadék** 2 mM L-glutaminnal, antibiotikumokkal és 5% FCS-sel kiegészítve,
- **szteroidmentes magzati borjúsérum** (Invitrogen/GIBCO, Carlsbad, CA, USA)
- **GKN-oldat:** 8 g NaCl, 0.4 g KCl, 1.77 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0.69 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 g D-glükóz, 0.01 g fenolvörös 1000 ml desztillált vízben beoldva, pH 7.4
- **PBS:** foszfáttal puffertelt fiziológiás sóoldat, pH 7.4
- **FACS-puffer:** 0.5% FCS és 1 g/l Na-azid tartalmú PBS
- **MACS puffer:** PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA
- **lízispuffer:** 10 mM Tris, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 130 mM NaCl, 10 mM Na-pirofoszfát, 1% Triton X-100, pH 7.2, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml pepstatin, 0.2 mM fenil-metil-szulfonil-fluorid (PMSF), 2 mM Na-O- vanadát
- **Hank-féle puffer:** 143 mM NaCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5 mM KCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM D-glükóz, 10 mM HEPES, pH 7.4
- **normál Ringer-oldat:** 160 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM HEPES, pH 7.4
- **kalciummentes Ringer-oldat:** 160 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES, pH 7.4
- **ACK oldat** (vörösvérsejt lízispuffer), 150 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA, pH 7.2- 7.4.
- **propidium-jodid tartalmú hipotóniás sejtpremeabilizáló/extraháló oldat:** 0.1% Na-citrát, 0.1% Triton X-100, 50  $\mu$ g/ml propidium-jodid
- **3%-os paraformaldehid (PFA)** frissen oldva PBS-ben.
- **30 %-os akrilamid oldat, 3,3 % N,N-metilén-bisakrilamiddal**

### 3.3. Reagenszek, festékek, ellenanyagok:

- **C<sub>2</sub>-ceramid (C<sub>2</sub>-CER)** (N-acetil-D-szfin gozin) (Biomol) dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldva
- **17 $\beta$ - $\beta$ sztradiol (E2)** (Sigma) 100%-os etanolban oldva
- **E2-BSA** 17 $\beta$ - $\beta$ sztradiol 6-(O-karboximetil)-oxim-BSA (Sigma)
- **E2-BSA-FITC** 17 $\beta$ - $\beta$ sztradiol 6-(O-karboximetil)-oxim-BSA-fluoreszcein izotiocianát konjugátum (Sigma)  
Az E2-BSA és E2-BSA-FITC preparátumokban levő szabad  $\beta$ sztradiolt ultraszűréssel távolítottuk el felhasználás előtt (*P.E. Stevis és munkatársai: Endocrinology, 1999. 140:5455-5458*).
- **BSA-FITC** marha szér um albumin fluoreszcein izotiocianáttal konjugálva
- **gramicidin** (Sigma) DMSO-ban oldva
- **ionomycin** (Sigma) DMSO-ban oldva
- **thapsigargin** (Sigma) DMSO-ban oldva
- **nifedipine** (Sigma) DMSO-ban oldva
- **(-) és (+) Bay K 8644** (Sigma) DMSO-ban oldva
- **BODIPY FL C<sub>5</sub>-ceramid BSA** komplexe (Invitrogen/Molecular Probes) desztillált vízben oldva
- **BODIPY FL-X ryanodine** (Invitrogen/Molecular Probes) DMSO-ban oldva
- **DiBAC<sub>4</sub>(3)** (bis-oxonol) (Invitrogen/Molecular Probes): negatív töltésű, lipofil, potenciál-szenzitív fluoreszcens festék, 300  $\mu$ M koncentrációban 100%-os etanolban oldva
- **propidium-jodid** (Sigma): fluoreszcens DNS-festék, 1 mg/ml koncentrációban PBS-ben oldva
- **DRAQ5** (Biostatus)
- **DiOC<sub>6</sub>(3)** (3,3'-dihexiloxakarbocianin-jodid) (Invitrogen/Molecular Probes): pozitív töltésű, lipofil, potenciál-szenzitív fluoreszcens festék, 0.1 M koncentrációban DMSO-ban oldva
- **Alexa 488, -555, -647 fluoreszcens festékek konjugált koleratoxin B-alegység** (Invitrogen/Molecular Probes): GM1-gangliozid (raftmarker lipid) festéshez, 40  $\mu$ g/ml koncentrációban PBS-ben oldva

- **Fluo-3 és Fluo-4 AM** (acetoxi-metilészter) (Invitrogen/Molecular Probes):  $\text{Ca}^{2+}$ -szelektív fluoreszcens indikátor, 1 mg/ml koncentrációban Pluronic F-127 tartalmú DMSO-ban oldva
- **Fura-2 AM** (acetoxi-metilészter) (Invitrogen/Molecular Probes):  $\text{Ca}^{2+}$ -szelektív fluoreszcens indikátor, 1 mg/ml koncentrációban Pluronic F-127 tartalmú DMSO-ban oldva
- **Asp2-Rhodamine 110** (Invitrogen/Molecular Probes) fluorogén kaspázszubsztrát, DMSO-ban oldva
- **$\text{H}_2\text{O}_2$**
- **tripánkék:** vitális festék sejtszámoláshoz, 0.8 g beoldva 500 ml 145 mM NaCl-oldatban
- **monoklonális anti-egér Fas** ellenanyag (Jo2), örmény hörcsög IgG2 izotípus (BD Pharmingen)
- **rekombináns  $\text{TNF}\alpha$**  (László Glória ELTE, Budapest)
- **monoklonális anti-ceramid ellenanyag** (MID-15B4), egér IgM (Alexis)
- **monoklonális anti-egér CD3** ellenanyag (145-2C11), hörcsög IgG (László Glória ELTE, Budapest)
- **monoklonális anti-humán CD3** (MEM-57), egér IgG2a (ImmunoTools)
- **kecske anti-egér IgM (Fab')<sub>2</sub>** ellenanyag (Dr. J. Haimovich, Tel Aviv University, Israel)
- **kecske anti-egér IgM-biotin** (Southern Biotechnology Associates, UK)
- **kecske anti-humán IgG+IgM (Fab')<sub>2</sub>** (Jackson ImmunoResearch)
- **2,4-dinitrobenzén-szulfonsav (DNP)-specifikus IgE** izotípusú monoklonális ellenanyag
- **DNP<sub>11</sub>-BSA konjugátum**
- **anti- $\text{Ca}_v1.2$**  nyúl poliklonális ellenanyag (Alomone Labs)
- **$\text{Ca}_v1.2$  kontroll peptid** (Alomone Labs)
- **anti- $\text{Ca}_v1.3$**  nyúl poliklonális ellenanyag (Alomone Labs)
- **$\text{Ca}_v1.3$  kontroll peptid** (Alomone Labs)
- **anti- $\text{ER}\alpha$**  (MC-20) poliklonális nyúl IgG, (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
- **anti- $\text{ER}\beta$  (Z8P1)** nyúl ellenanyag (Zymed, San Francisco, CA, USA)

- **nyúl anti-hőrcsög IgG** (Southern Biotechnology Associates,UK)
- **anti-egér CD24 (HSA)** patkány IgG2bk, M1.69.16.11. (László Glória ELTE, Budapest)
- **Alexa 647-tel konjugált anti-egér Thy-1 (CD90)** patkány IgG2ck, G7.4 klón (László Glória ELTE, Budapest)
- **fikoeritrinnel (PE) konjugált anti-humán CD3** (Immunotools)
- **anti-humán CD48 Alexa 488** (MEM-102)
- **FITC-cel és Cy5-tel konjugált anti-egér IgM (II/41)** ellenanyag (László Glória ELTE, Budapest)
- **kecske anti-nyúl IgG (H+L) Alexa Fluor 488 és -647** (Invitrogen/Molecular Probes, Carlsbad, CA,USA)
- **Alexa 647-tel konjugált anti patkány IgG2b (MAR 4/4)** egér IgG1, (László Glória ELTE, Budapest)
- **anti-foszfo-AKT 1/2/3 (Ser473)** affinitás tisztított poliklonális nyúl IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
- **anti-foszfo-p44 (ERK 1) / p42 (ERK2) (Thr202/Tyr204)** poliklonális nyúl IgG (Cell Signaling Technology, MA, USA)
- **anti-foszfo-ERK1 (Thr 202/Tyr204) / ERK2 (Thr185/Tyr187)** poliklonális nyúl ellenanyag (Sigma)
- **anti-ERK** monoklonális egér IgG2a (Transduction Laboratories, UK)
- **anti-SH-PTP2** poliklonális nyúl IgG, C-18 (Santa Cruz Biotechnology,CA, USA)
- **kecske anti-egér IgM és IgG -HRP** (Southern Biotechnology Associates,UK)
- **kecske anti-nyúl IgG (H+L)-HRP** (Southern Biotechnology Associates,UK)
- **K9.361** egér FcγRII / III specifikus egér monoklonális IgG2a (László Glória ELTE, Budapest)



### 3.4. Módszerek

#### 3.4.1. Lépsejteket izolálása, T- és B-sejt szeparálás

A 6-8 hetes C57BL/6 nőtény egerekből, cervikális diszlokációt követően, eltávolítottuk a lépet. A lépsejteket fenolvöröst nem tartalmazó GKN oldatban mechanikai roncsolással nyertük ki. A vörösvérsejtek lízisét 5 ml ACK oldattal 1 percig történő kezeléssel váltottuk ki.

A T-sejteket *MACS* mágneses szeparáló rendszerrel izoláltuk (Miltenyi Biotech. GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) a használati útmutatónak megfelelően, negatív szelekciós eljárást alkalmazva. A szeparálás során biotinnal konjugált kecske anti-egér IgM ellenanyagot, anti-biotin ellenanyaggal fedett mágneses szeparáló gyöngyöt (Miltenyi Biotech.) és LS típusú MACS oszlopot használtunk. A kapott T-sejtben gazdag frakciót fenolvörös nélküli RPMI 1640 médiumban szuszpendáltuk fel.

A B-sejtek szeparálásához negatív szelekción alapuló *EasySep Mouse B cell Enrichment kitet* (StemCell Technologies) használtunk, szintén a gyártó cég ajánlása szerint. A szeparálás hatékonyságát áramlási citofluorimetriás méréssel ellenőriztük.

#### 3.4.2. Immunfluoreszcens jelölések, áramlási citometria, konfokális mikroszkópia

A kísérletek során  $10^6$  sejtet használtunk mintánként.

*A sejtfelszíni ceramidfelszabadulás detektálásakor* az IP12-7 T-sejteket 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-egér Fas (Jo2) ellenanyaggal vagy 20  $\text{ng/ml}$  TNF $\alpha$ -val kezeltük 37°C-on komplett RPMI médiumban. Adott időt követően a sejteket mostuk jéghideg FACS-pufferben, majd anti-ceramid ellenanyaggal és fluoreszcens másodlagos ellenanyaggal jelöltük jégen 30-30 percig. A sejteket 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig jégen.

*A fluoreszcens ceramid felvételének vizsgálata során* a Jurkat T-sejteket jéghideg Hank-féle pufferrel végzett mosást követően 5  $\mu\text{M}$  Bodipy FL C<sub>5</sub>-ceramid jelenlétében 30 percig jégen jelöltük. Mosást követően a sejteket további 1, 5, 30 percig 37°C-on inkubáltuk, végül jéghideg 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig jégen.

*A ceramid raftlokalizációra gyakorolt hatásának vizsgálatakor* a Jurkat sejteket 25  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban C<sub>2</sub>-ceramiddal kezeltük 37°C-on médiumban, majd mostuk jéghideg FACS-pufferrel. A sejteket anti-humán CD3-PE és anti-humán CD48-Alexa 488 ellenanyaggal 30 percig, az Alexa 647-tel konjugált Cholera toxin B-vel 10 percig

jelöltük jégén. Mosást követően a sejteket 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig jégén.

*A  $Ca_v$ -ionszatornák lokalizációjának vizsgálatakor* bizonyos esetekben a sejteket Alexa 488 illetve -647-tel konjugált Cholera toxin B-vel jelöltük 10 percig jégén, máskor az endoplazmás retikulum (ER) festéséhez BODIPY FL-X ryanodine-nal 1  $\mu$ M végkoncentrációban 10 percig 37°C-on festettük. Mosást követően a sejteket 0.1% szaponint tartalmazó FACS-pufferben permeabilizáltuk, majd 3  $\mu$ g/ml végkoncentrációban anti- $Ca_v1.2$  és anti- $Ca_v1.3$  ellenanyaggal jelöltük jégén 30 percig. Az ellenanyagok specifikitásának ellenőrzésére szolgáló kontroll mintáknál az ellenanyagokat, a sejtekhez történő hozzáadás előtt, a nekik megfelelő kontrollpeptid feleslegben vett mennyiségével (3  $\mu$ g/ml) inkubáltuk együtt szobahőmérsékleten 30 percig. Másodlagos ellenanyagként Alexa 488 illetve -647-tel konjugált anti-nyúl IgG (H+L) reagenst használtunk. A sejtmagok festéséhez DNS-specifikus DRAQ5 festéket használtunk 2.5  $\mu$ M végkoncentrációban. A jelölés végén a sejteket 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig jégén.

*A klasszikus  $ER\alpha$  és  $-\beta$  intracelluláris lokalizációjának vizsgálata során* a sejteket Alexa 555-Cholera toxin B-vel jelöltük 10 percig jégén. Mosást követően a sejteket 0.1% szaponint tartalmazó FACS-pufferben permeabilizáltuk, majd nyúl poliklonális anti- $ER\alpha$  illetve nyúl anti- $ER\beta$  ellenanyaggal jelöltük jégén 30 percig. Mosás után a sejteket Alexa 488 vagy -647-tel konjugált anti-nyúl IgG (H+L) ellenanyaggal, valamint a sejtmag festéséhez 2.5  $\mu$ M DRAQ5 DNS-festékkel inkubáltuk 30 percig jégén. Mosást követően a sejteket 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig jégén.

*A plazmamembrán ösztrogénreceptorok jelölésekor* a sejteket 1 mg/ml végkoncentrációban E2-BSA-FITC-cel, kontrollként BSA-FITC-cel inkubáltuk szobahőmérsékleten 15 percig. A kolokalizációs kísérleteknél a sejteket Alexa 555-Cholera toxin B-vel, a T-sejtek esetében Alexa 647-tel konjugált patkány anti-egér Thy-1-gyel, a B-sejtek esetében patkány anti-egér CD24-gyel és Alexa 647-tel jelölt anti patkány IgG2b ellenanyaggal jelöltük. Mosást követően a sejteket a sejteket 3%-os paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig jégén.

*Az áramlási citometriás méréseket egy Ar<sup>+</sup> lézerrel (488 nm) és egy vörös dióda lézerrel (~ 635 nm) felszerelt BD FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, CA, USA) készülékkel végeztük. Az adatgyűjtés és kiértékelés CellQuest Pro szoftverrel (Becton-Dickinson) történt.*

*A fluoreszcens mikroszkópiás felvételek egy Ar<sup>+</sup> lézerrel (488 nm), egy zöld (543 nm) és egy vörös (632 nm) lézerrel felszerelt Olympus IX81 FLUOView 500 lézerpáztázó konfokális mikroszkóppal (Hamburg, Germany) készültek. A fluoreszcens és DIC (differenciál interferencia kontraszt) képek 512×512 pixel képfelbontásban, 10× száraz és 60× olajimmerziós objektívvel kerültek felvételre. A képfeldolgozást és kiértékelést a "Wright Cell Imaging Facility" weboldaláról elérhető Image J szoftverrel (Wayne Rasband, NIH, Bethesda) és kolokalizációs segédprogramjaival végeztük.*

### **3.4.3. A plazmamembrán-potenciál vizsgálata áramlási citofluoriméterrel**

Mintánként 10<sup>6</sup> sejtet 2 ml PBS-ben szuszpendáltunk, és 150 nM bis-oxonol (DiBAC<sub>4</sub>(3)) potenciálérzékeny fluoreszcens festék jelenlétében 10 percig, sötétben, 37 °C-on történő inkubáltunk, majd a sejtekhez 1 µg/ml végkoncentrációban propidium-jodidot adtunk a halott sejtek mérésből történő kizárása érdekében. Ezt követően BD FACSCalibur áramlási citofluoriméterrel, az FL1 csatornában mértük a bis-oxonol, FL3 csatornában pedig a propidium-jodid fluoreszcenciáját. Ezután az egyes mintákat C<sub>2</sub>-ceramiddal vagy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vel kezeltük adott végkoncentrációban, majd 20 percig követtük nyomon a propidium-jodid festésre negatív sejtek bis-oxonol fluoreszcenciáját. A DiBAC<sub>4</sub>(3) egy negatív töltésű, potenciálérzékeny fluoreszcens festék, amelynek sejtek általi felvétele az extracelluláris tér és membrán közötti potenciálfüggő megoszlási egyensúly alapján történik. A plazmamembrán-potenciál nyugvó T-sejtekben általában a K<sup>+</sup> ionok egyensúlyi kémiai potenciáljának megfelelő, -55 mV körüli érték. A sejtmembrán depolarizációja esetén fokozott festékfelvétel, míg hiperpolarizáció esetén csökkent festékfelvétel tapasztalható. Bizonyos esetekben 100 µM LaCl<sub>3</sub> jelenlétében vizsgáltuk a változásokat. A maximális depolarizáció kiváltására 100 mM KCl-ot és 10 µM gramicidint (K<sup>+</sup>-ionoför) adtunk a sejtekhez.

### 3.4.4 Az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulás vizsgálata

*Az áramlási citometriás vizsgálatok során  $5 \times 10^6$  sejtet 1 ml komplett RPMI médiumban vettünk fel, és 10  $\mu\text{g/ml}$  Fluo-3 vagy Fluo-4 AM  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzitív fluoreszcens festék jelenlétében 30 percig 37 °C-os rázatófürdőben, majd 9 ml komplett RPMI hozzáadása után további 30 percig inkubáltuk. Kétszeri GKN-oldattal végzett mosás után a sejtek koncentrációját komplett RPMI-vel  $1 \times 10^6/\text{ml}$ -re állítottuk be. A mintákhoz 1 mg/ml végkoncentrációban propidium-jodidot adtunk az elpusztult sejtek mérés közbeni elkülöníthetősége érdekében. A Fluo-3 és Fluo-4 festék jelét az áramlási citométer FL1 csatornájában, a propidium-jodid jelét az FL3 csatornában detektáltuk. Az alapjel felvételét követően az IP12-7 sejteket  $\text{HA}_{317-329}$  influenzapeptiddel előinkubált 2PK3 B-sejtekkel, mint antigéprezentáló sejtekkel, a korábban már leírt módon (104) aktiváltuk. A Jurkat T-sejteket 1  $\mu\text{g/ml}$  anti-humán CD3 ellenanyaggal, az egér eredetű B-sejteket 3  $\mu\text{g/ml}$  anti-egér IgM (Fab')<sub>2</sub> ellenanyaggal, a humán B-sejteket 0.5  $\mu\text{g/ml}$  anti-humán IgG+IgM (Fab')<sub>2</sub> ellenanyaggal aktiváltuk. Az RBL-2H3 sejteket az aktiváció előtt 2,4-dinitrobenzén-szulfonsav (DNP)-specifikus IgE izotípusú monoklonális ellenanyaggal szenzitizáltuk, majd 50 ng/ml DNP<sub>11</sub>-BSA konjugátummal aktiváltuk.*

*A  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál egyedi sejtek szintjén történő vizsgálatok a sejteket fenolvörös mentes RPMI-1640 médiumban normál Ringer-oldatban szuszpendáltuk fel a sejtkoncentrációt  $5 \times 10^6/\text{ml}$ -re állítva. A speciálisan mikroszkópiás célra használatos sejtenyésző kamrában (Lab-Tek borosilicate chambered coverglass (NUNC, Rochester, NY, USA)) 100-100  $\mu\text{l}$  sejtet cseppentettünk ki mintánként, és 30 percig szobahőmérsékleten hagytuk a sejteket kitapadni az üvegfelszínrre. Ezt követően a sejteket 10  $\mu\text{g/ml}$  Fluo-4 festékkel inkubáltuk fenolvörös mentes RPMI-1640 médiumban 37 °C-on  $\text{CO}_2$ -termosztátban 30 percig. Óvatos mosást követően a sejtekre fenolvörös mentes RPMI-1640 médiumot pipettáztunk, majd 100 nM E2-vel vagy E2-BSA-val illetve 1  $\mu\text{g/ml}$  ionomycinnel kezeltük őket. Az egyedi sejtek fluoreszcenciájának időbeli változását Olympus IX81 FLUOView 500 lézerpáztázó konfokális mikroszkóppal követtük, 10× objektívet alkalmazva, 0.44 sec/képkocka időfelbontással. A Fluo-4 festék gerjesztéséhez az  $\text{Ar}^+$ -lézer 488 nm hullámhosszúságú vonalát használtuk. Az adatok feldolgozásakor a sejtenkénti átlagfluoreszcencia-intenzitásokat a sejtek DIC képen kapott fényintenzitási értékeire normalizáltuk. A Fura-2 festékkel végzett mérések során a sejteket normál Ringer-oldatban szuszpendáltuk fel a sejtkoncentrációt  $5 \times 10^6/\text{ml}$ -re*

állítva. 100-100 µl sejtet cseppentettünk ki mintánként a perfúziós kamrába, és 30 percig szobahőmérsékleten hagytuk a sejteket kitapadni az üvegfelszínrre. A sejteket 1 µM Fura-2 festékkel normál Ringer-oldatban inkubáltuk 37 °C-on CO<sub>2</sub>-termosztátban 30 percig. Óvatos mosást követően a sejtekre normál Ringer-oldatot pipettáztunk, majd 100 µM végkoncentrációban az L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatorna antagonistá (+) Bay K 8644-gyel illetve agonistá (-) Bay K 8644-gyel kezeltük a sejteket normál illetve kalciummentes Ringer-oldatban perfúziós rendszerben. A mérés során a Fura-2 Ca<sup>2+</sup>-t kötött formájának megfelelő 350 nm-, illetve a festék szabad formájának megfelelő 390 nm hullámhosszúságú fénnel történő gerjesztés mellett 510 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást, majd az adatok kiértékelésekor a gerjesztési hullámhosszakon kapott fluoreszcencia intenzitási értékek hányadosát (350 nm/390 nm) képeztük.

#### **3.4.5. A kaszpázaktivitás áramlási citometriás vizsgálata**

Mintánként  $2.5 \times 10^5$  IP12-7 sejtet 1 ml komplett RPMI tápoldatban 25 µM C<sub>2</sub>-ceramiddal kezeltünk 37 °C-on CO<sub>2</sub>-termosztátban 24-lyukú sejtenyésző lemezen. Az inkubációs idő elteltével a sejteket egyszer mostuk, majd inkubáltuk 50 µl Hank-féle pufferben 50 µM Asp<sub>2</sub>-Rhodamine 110 fluorogén általános kaszpázszubsztrát jelenlétében 30 percig 37 °C-on CO<sub>2</sub>-termosztátban. Mosást követően a sejteket 300 µl 1 µg/ml végkoncentrációban propidium-jodidot tartalmazó jéghideg Hank-féle pufferben szuszpendáltuk. Aktív kaszpázok hatására a sejtekbe került szubsztrátmolekuláról lehasadnak az aszpartát-oldaláncok, és az így felszabadult Rhodamine 110 festék fluoreszcenssé válik. A Rhodamine festék jelét az áramlási citométer FL1 csatornájában, a propidium-jodid jelét az FL3 csatornájában detektáltuk. Az értékelés során a propidium-jodidra negatív sejtek Rhodamin 110 fluoreszcenciáját hasonlítottuk össze.

#### **3.4.6. A mitokondriális membránpotenciál áramlási citometriás vizsgálata**

24-lyukú sejtenyésző lemezen lyukanként  $2.5 \times 10^5$  sejtet 1 ml komplett RPMI tápoldatban adott végkoncentrációban C<sub>2</sub>-ceramiddal kezelve 37 °C-on inkubáltunk CO<sub>2</sub>-termosztátban. Ezután a sejteket mostuk, majd 50 µl Hank-féle pufferben 100 nM DiOC<sub>6</sub>(3) jelenlétében 30 percig 37 °C-on CO<sub>2</sub>-termosztátban inkubáltuk. Újabb mosást követően a sejteket 1 µg/ml végkoncentrációban propidium-jodidot tartalmazó jéghideg

Hank-féle pufferben szuszpendáltuk. A DiOC<sub>6</sub>(3) lipofil jellegének és pozitív töltésének köszönhetően képes bejutni a sejt belsejébe és ott a negatívan töltött organellekhez, mint pl. a mitokondriumhoz, kötődni, mégpedig annak töltöttségi állapota által meghatározott mértékben. Így ha a mitokondrium depolarizálódik, a sejtek kisebb mértékben veszik fel a festéket, ezáltal csökkent mértékű fluoreszcencia intenzitást tapasztalhatunk. A DiOC<sub>6</sub>(3) festék fluoreszcens jelét az áramlási citofluoriméter FL1 csatornájában, a propidium-jodid jelét az FL3 csatornában detektáltuk.

### 3.4.7. A DNS-fragmentáció áramlási citometriás vizsgálata

Komplett RPMI tápoldattal készült  $2.5 \times 10^5$  sejt/ml koncentrációjú sejtszuszpenzió 1-1 ml-ét osztottuk szét lyukanként 24-lyukú sejtenyészítő lemezen. A sejteket adott koncentrációjú C<sub>2</sub>-ceramid jelenlétében 6 órán át 37 °C-on inkubáltuk CO<sub>2</sub>-termosztátban. Ezt követően a sejteket lecentrifugáltuk és a pelletet 300 µl propidium-jodid tartalmú hipotóniás permeabilizáló oldatban vettük fel, majd 4 órán át 4 °C-on tovább inkubáltuk. A minták fluoreszcencia intenzitásának mérése az áramlási citofluoriméter FL3 csatornájában történt.

### 3.4.8. Sejtstimulálás, sejtlyzisz, SDS-PAGE gélelektroforézis és Western blot

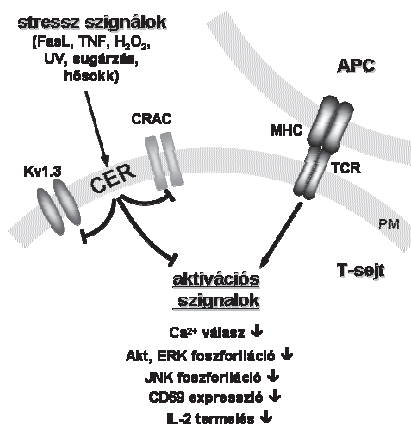
Mintaként  $5 \times 10^6$  sejtet használtunk. A sejteket az aktiválás előtt 1 órával szérummentes médiumban vettük fel, és 37 °C-on CO<sub>2</sub>-termosztátban inkubáltuk. *A ceramiddal végzett kísérletek során* a sejteket 10 percig 25 µM C<sub>2</sub>-ceramiddal illetve kontrollként DMSO-val kezeltük, majd mosást követően 3 µg/ml anti-egér IgM (Fab')<sub>2</sub> ellenanyaggal vagy 0.5 µg/ml anti-humán IgG+IgM (Fab')<sub>2</sub> ellenanyaggal aktiváltuk különböző ideig (10 másodperc, 1 perc, 10 perc). *Az ösztrogénnel kapcsolatos vizsgálatoknál* a sejteket 1 nM, 10 nM, 100 nM 17β-ösztradiollal, kontrollként az ösztrogénnek megfelelő mennyiségű 100%-os etanollal, a T-sejteket 50 µg/ml anti-egér CD3 ellenanyaggal, a B-sejteket 6 µg/ml anti-egér IgM (Fab')<sub>2</sub> ellenanyaggal kezeltük 5 percig. Az aktivációs idő lejártával a sejteket lecentrifugáltuk (14000 rpm, 20 másodperc), a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejtpeletteket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Ezt követően a sejteket 100 µl lizis pufferben 30 percen keresztül inkubáltuk jégen időnként erős szuszpendálást alkalmazva, majd a mintákat 14000×g sebességgel 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszókból 80-80 µl-t 20-20 µl

ötszörös töménységű SDS-PAGE mintapufferrel 5 percig 95 °C-on inkubáltunk. Az elkészített mintákból zsebenként 20-20 µl-t vittünk fel a 0.75mm vastagságú 10%-os SDS-PAGE géltre. Az elektroforézist Bio-Rad márkájú *Mini-PROTEAN 3 Cell* készülékben végeztük 140 V feszültség mellett. Az elektroforézis során szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) blottoltuk 25 V feszültségen 30 percig Bio-Rad *Trans-Blot Semi Dry* készülékben. A kiválasztott célfehérjék kimutatásához a membránokat adott specificitású elsődleges ellenanyaggal, illetve HRP-vel konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, majd Super Signal West Pico kemilumineszcens reagens (Pierce) segítségével Kodak röntgenfilmen hívtuk elő.

## 4. Eredmények

### 4.1. Ceramidok szabályozó hatásai a T sejtek aktiváció/sejthalál egyensúlyára

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a ceramid apoptotikus hatása a T-helper ( $T_H$ ) sejtekben a szignál erőssége és időtartama által szigorúan meghatározott (104). Míg az erős, hosszabb ideig fennálló ( $> 1$  óra) stimulusok az apoptózis valamennyi jellegzetes folyamatát (sejtfelszíni foszfatidil-szerin transzlokáció, mitokondriális depolarizáció, az effektor kaszpáz-3 aktivációja, DNS-fragmentáció) aktiválják, addig a mérsékelt, rövid idejű (10 perc) szignálok esetén ezek egyike sem tapasztalható, a T-sejtek életképessége nem változik. A jelenséget tovább vizsgálva, az apoptózist nem indukáló ceramidstimulusok azonban hatékonyan gátolni képesek a T-sejt aktiváció korai ( $Ca^{2+}$ -szignál, Akt- és ERK foszforiláció) és késői jelátviteli elemeit (CD69 expresszió, IL-2 termelés) (1. ábra). Az aktivációs  $Ca^{2+}$ -szignált érintő gátlás háttérmechanizmusával kapcsolatban sikerült azonosítanunk néhány lehetséges okot: membránszerkezeti hatások, plazmamembrán-depolarizáció, a Kv1.3 feszültségfüggő  $K^+$ -csatornára kifejtett gátló hatás, folyamat részleteinek megértése viszont további vizsgálatokat igényel. Így célunk volt a ceramid membránhatásainak további vizsgálata, a  $Ca^{2+}$ -szignált érintő esetleges további részletek tisztázása, valamint a ceramid újabb célpontjainak azonosítása.



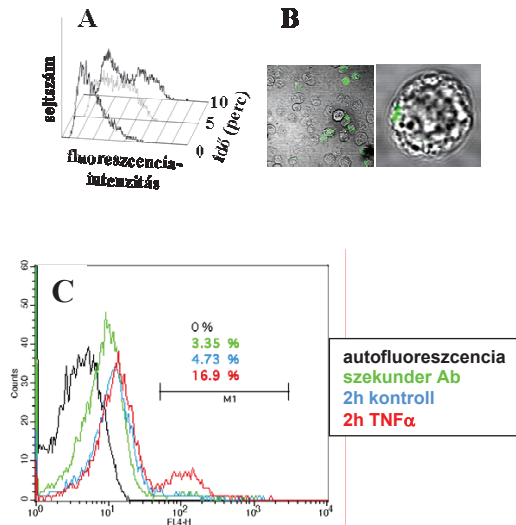
1. ábra: A stresszindukált ceramidszignálok antigénspecifikus T-sejt aktivációra gyakorolt gátló hatása (Gombos és munkatársai nyomán, *Immunology Letters*, 2006;104: 59-69)



#### 4.1.1. A receptorindukált ceramidfelszabadulás detektálása és a ceramid „útja” a T-sejtben

A receptor- illetve stressz szignálok által indukált szfingomielinhidrolízis kinetikája az azt kiváltó stimulustól és az érintett sejt típusától függ, általánosságban azonban két forma különíthető el. Az esetek nagy többségében a szfingomielin hidrolízise a stimulust követően már viszonylag rövid időn belül, pár perc után detektálható, amely arra utal, hogy ez a korai esemény a plazmamembrán közelében zajlik, és a savas és neutrális szfingomielináz aktiválódásának köszönhető. Ugyanakkor sok esetben megfigyelhető egy csak órákkal később jelentkező ceramidszintbeli növekedés, amelyben a neutrális szfingomielináznak és a *de novo* ceramidszintézisnek van szerepe. Utóbbi valószínűsíti, hogy a szfingomielin-ceramid útvonal az apoptózis késői, effektor szakaszában is ellát bizonyos funkciókat, pl. az apoptotikus sejt felszíni membránlefűződéseket (blebek) képződésében (46, 51).

Megvizsgáltuk, hogy két bizonyítottan szfingomielinhidrolízist kiváltó receptor (Fas, TNFR) stimulálása esetén mikor jelentkezik először detektálható mennyiségű membránceramid az általunk modellsejtként kiválasztott IP12-7 T<sub>H</sub>-sejteken (**2. ábra**).



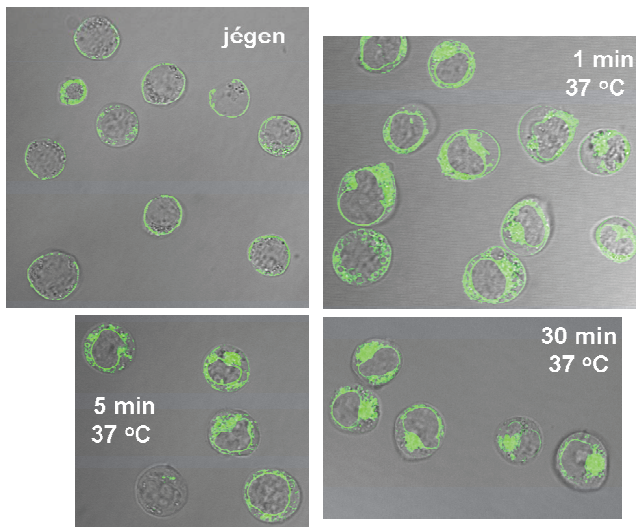
**2. ábra: A Fas és TNF-receptorok stimulálását követő membránceramid-felszabadulás detektálása IP12-7 T-sejteken**

A sejteket 1 µg/ml anti-Fas (Jo2) ellenanyaggal (A, B) illetve 20 ng/ml TNF $\alpha$ -val kezeltük 37 °C-on. Adott időt követően a sejteket PBS-ben mostuk, majd monoklonális anti-ceramid ellenanyaggal és rá specifikus fluoreszcens másodlagos ellenanyaggal jelöltük. A fluoreszcenciaintenzitás vizsgálatát áramlási citofluorimetriával (A, C) illetve konfokális lézerpasztázó mikroszkópiával (B). vizsgáltuk (DIC+fluoreszcens kép).

Eredményeink szerint a sejtek jelentős százalékában ceramidfelszabadulás tapasztalható a Fas receptor stimulálását követően rendkívül gyorsan, 5-10 percen belül. Ugyanakkor a TNF-receptoron keresztüli aktiváció után csak mintegy 2 órával detektálható először ceramidakkumuláció a sejtekben. A konfokális mikroszkópiás vizsgálat szerint a Fas receptor esetében az anti-ceramid ellenanyag jellegzetes foltos membránfestődést mutat a sejteken.

A ceramid a természetben előforduló egyik leghidrofóbbabb lipidféleség, ebből a tulajdonságból adódóan a ceramidmolekulák a szfingomielinből való felszabadulást követően jellemzően membránhoz kötött állapotban maradnak, így valószínűsíthető, hogy sokrétű biológiai hatásukat is a membránokra illetve a membránokhoz asszociálódó célmolekulákra kifejtve érik el. Pagano és munkatársai fibroblaszt sejteken kimutatták, hogy a fluoreszcens ceramidanalógok gyors internalizációt követően hamar feldúsulnak a endoszomális- illetve Golgi rendszerben, így ideális „eszközként” alkalmazhatók a szfingolipidek intracelluláris nyomkövetésére (105).

A ceramid sejtfelszíni és intracelluláris membránok közti megoszlásának tanulmányozása érdekében fluoreszcens Bodipy FL C<sub>5</sub>-ceramid felvételt vizsgáltuk Jurkat humán T-sejteken **(3. ábra)**.



**3. ábra: A Jurkat T-sejtek fluoreszcens Bodipy FL C<sub>5</sub>-ceramid felvétele**

A sejteket 5 $\mu$ M Bodipy FL C<sub>5</sub>-ceramid jelenlétében 30 percig jégen jelöltük majd mosást követően további 1, 5, 30 percig 37°C-on inkubáltuk, végül paraformaldehiddel fixáltuk. Ezt követően konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk a fluoreszcens ceramid sejten belüli eloszlását (DIC+fluoreszcencia).

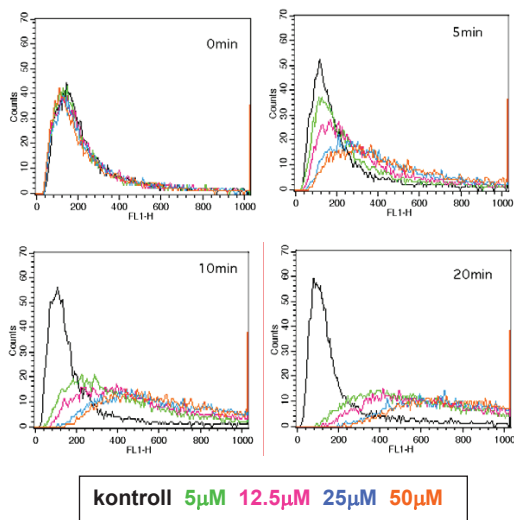
Mikroszkópos felvételeink alapján megállapíthatjuk, hogy a plazmamembránban felhalmozódott ceramid rendkívül gyorsan eléri a T-sejtek intracelluláris membránkompartmentjeit. 1-5 percet követően a plazmamembrán mellett már észrevehető citoplazmatikus vezikulákban, 30 percnél pedig már szinte csak a sejtmaghártyához asszociálódott membránkompartmentekben helyezkedik el.

#### 4.1.2. A ceramidok membránstruktúrára és membránpotenciálra gyakorolt hatásai

Korábbi vizsgálatok rámutattak, hogy a T-sejtek effektor funkciót kiváltó aktivációja és a sejthalál szempontjából egyaránt fontos Ca<sup>2+</sup>-szignálokat több ioncsatorna is szabályozza (pl. K<sub>v</sub>1.3 feszültségvezérelt vagy K<sub>Ca</sub> kalciumaktivált K<sup>+</sup>-csatornák), amelyek aktivitása ugyanakkor ceramidra érzékenynek bizonyult. A Fas/ceramid jelpálya az src-szerű kinázok (pl. Lck molekula) közvetítésével, egy eddig még nem tisztázott módon gátolni képes a sejt nyugalmi membránpotenciáljának fenntartását biztosító K<sub>v</sub>1.3 K<sup>+</sup>-csatornák működését (84, 85). Munkacsoportunk korábbi eredményei (104) szintén

megerősítették a ceramid  $K_v1.3$  csatornára gyakorolt gátló hatását T-sejteken. Ezzel párhuzamosan megfigyeltük, hogy a plazmamembránban fellépő ceramidakkumuláció egyik rendkívül szembetűnő membránhatása a T-sejtek plazmamembránjának jelentős mértékű depolarizációja.

Tekintve hogy a  $K_v1.3$  csatorna a T-sejtek nyugalmi membránpotenciáljának fenntartásáért felelős, megvizsgáltuk, vajon a ceramid által kiváltott plazmamembránpotenciál csökkenés mennyiben következménye a  $K_v1.3$  csatornákra kifejtett Lck-függő gátló hatásnak. A kérdés eldöntésére Lck-deficiens JCam Jurkat T-sejteken potenciálérzékeny fluoreszcens festék (bis-oxonol) segítségével követtük a ceramid plazmamembránpotenciálra gyakorolt hatását (4. ábra).



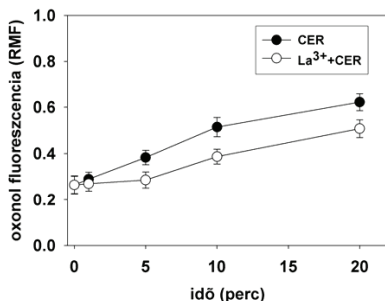
#### 4. ábra A ceramid plazmamembránpotenciálra gyakorolt hatása Lck-deficiens JCam Jurkat T-sejteken

A JCam Jurkat sejteket bis-oxonol potenciálszenzitív fluoreszcens festékkel történő jelölést követően 0 (kontroll), 5, 12.5, 25 és 50  $\mu$ M  $C_2$ -ceramiddal kezeltük, majd áramlási citometriával követtük a fluoreszcencia időbeli változását. A bis-oxonol-fluoreszcencia növekedése a plazmamembrán depolarizációjára utal.

A 4. ábrán bemutatott eredmény alapján a ceramid által indukált drasztikus plazmamembrán-depolarizáció (a bis-oxonol fluoreszcencia növekedése) az Lck src kináz

hiányában is megnyilvánul, így a hatás valószínűleg nem a  $K_v1.3$  csatornák aktivitásának ceramidfüggő gátlásával magyarázható.

Mivel a ceramidcsatornák kialakulása  $La^{3+}$  ionokkal gátolható (69), a ceramidcsatornák depolarizációs hatásban játszott szerepének tisztázására  $La^{3+}$  ionok jelenlétében is megvizsgáltuk a jelenséget (5. ábra).



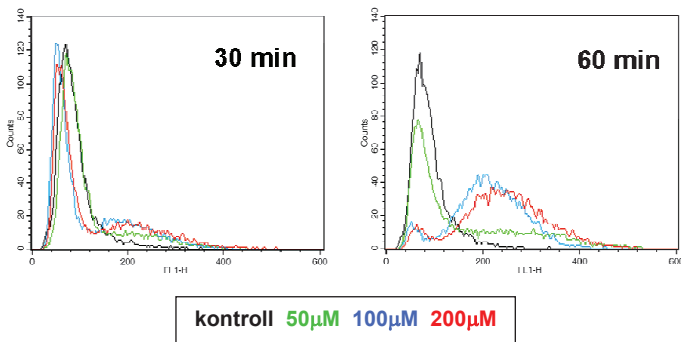
**5. ábra: A ceramid plazmamembránra kifejtett depolarizáló hatása  $La^{3+}$  ionok jelenlétében**

Az IP12-7 T-sejteket bis-oxonol potenciálszenzitív fluoreszcens festékkel történő jelölést követően  $25 \mu M$   $C_2$ -ceramiddal kezeltük  $100 \mu M$   $LaCl_3$  jelenlétében illetve nélkül, és áramlási citometriával követtük nyomon a fluoreszcencia időbeli változását. A fluoreszcencia átlagértékeket a sejtek  $100 mM$  KCl +  $10 \mu M$  gramicidin mellett (maximális depolarizáció) kapott fluoreszcenciaértékre normalizálva (RMF) és a standard deviáció feltüntetésével ábrázoltuk.

Az IP12-7 sejteken végzett vizsgálataink szerint a  $La^{3+}$  ionok jelenléte gátolja a ceramidindukált plazmamembrán-depolarizációt, ám nem teljes mértékben. A fentiek tekintetében így nem zárható ki, hogy a ceramid által okozott membránpotenciál-csökkenés hátterében a ceramidcsatornák képződésén kívül a sejtek ionháztartását befolyásoló egyéb tényezők, mint pl. a ceramid által aktivált  $Cl^-$ -csatornák is szerepet játszhatnak (106).

Korábbi vizsgálatainkban a ceramidszignálok membrándepolarizáló hatását a T-sejtek szfingomielinázsal történő kezelése esetén is kimutattuk. A továbbiakban vizsgálni kívántuk, hogy az irodalmi adatok alapján ceramidfelszabadulást kiváltó stresszhatások szintén kiváltnak-e hasonló hatást. A neutrális szfingomielináznak fontos szerepet tulajdonítanak az oxidatív stresszhatások illetve reaktív oxigéngyökök által indukált apoptózis folyamatában (45). Az oxidáló hatású vegyületek viszonylag gyors, jellemzően a kezelést követő 1 órán belül ceramidakkumulációhoz vezetnek az érintett sejtekben.

Vizsgálataink szerint az exogén  $\text{H}_2\text{O}_2$  dózis- és időfüggő módon vált ki membránde polarizációt az IP12-7 T-sejteken (6. ábra).



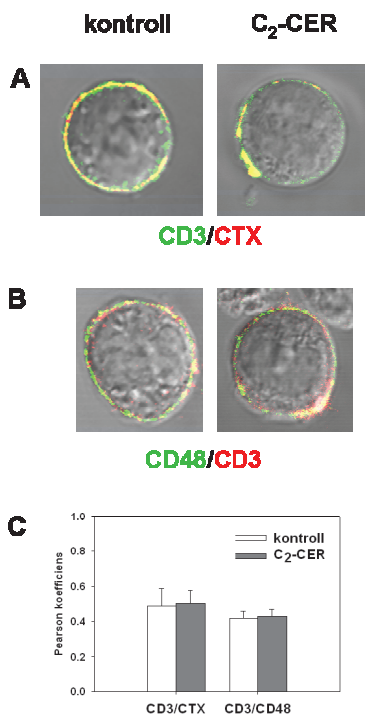
**6. ábra: A  $\text{H}_2\text{O}_2$  hatása az IP12-7 sejtek plazmamembrán-potenciáljára**

Az IP12-7 T-sejteket bis-oxonol potenciálszenzitív fluoreszcens festékkel történő jelölést követően 0 (kontroll), 50, 100, 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel kezeltük, majd áramlási citometriával követtük a fluoreszcencia időbeli változását.

A ceramidok membránszerkezetre gyakorolt hatásaival kapcsolatban kimutatták, hogy a ceramidmolekulák biofizikai sajátosságaikból adódóan nagyfokú öngaggregálódási hajlammal rendelkeznek mesterséges lipid membránokban. Ezen túlmenően számos sejtfelszíni receptorról (pl. Fas/CD95, CD40,  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ , CD28) derült ki, hogy azok stimulálása szfingomielinázok aktivációjához vezet a sejtekben, amelyet a sejtfelszínen nagy méretű, ceramidban gazdag membrándoméek kialakulása követ (37, 38, 107, 108). Immunfluoreszcens jelölési technikán alapuló mikroszkópos vizsgálatokban bebizonyították, hogy a ceramidban gazdag membrándoméek nagyfokú kolokalizációt mutatnak a stimulált sejtfelszíni receptorról, továbbá a raftmarkerként leírt GM1 ganglioziddal és az aktivációt követően a sejtfelszínre transzlokálódott savas szfingomielinázal. Az elképzelés szerint a ceramidban gazdag membrándoméek egyfajta jelátviteli platformokat képeznek, amelyek elősegítik az adott receptor stimulációt követő sejtfelszíni átrendeződését (receptorklaszterek kialakulását) és raftokba kerülését, valamint a receptoron keresztül hatékony jelátviteli folyamatok kialakulását.

Jurkat sejteken végzett vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy vajon a T-sejtek exogén  $\text{C}_2$ -ceramiddal történő kezelése következtében is kialakulnak-e nagyobb

méretű sejtfelszíni membránplatformok, és ha igen, ez hatással van-e bizonyos membránfehérjék, pl. a T-sejt receptorok sejtfelszíni lokalizációjára. Ehhez 10 perces 25  $\mu$ M C<sub>2</sub>-ceramiddal történő kezelést követően fluoreszcensen jelölt CD48-, illetve CD3-specifikus ellenanyaggal, valamint CTX-B-vel jelöltük a sejteket, majd konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a mintákat (7. ábra).



**7. ábra:** Az exogén C<sub>2</sub>-ceramid kezelés hatása a raftok és a CD3 molekula sejtfelszíni lokalizációjára T-sejteken

A Jurkat T-sejteket 10 percig 25  $\mu$ M C<sub>2</sub>-ceramiddal illetve kontrollként a ceramidnak megfelelő mennyiségű DMSO-val kezeltük, majd anti-CD48 Alexa 488, anti-CD3 PE és Alexa 647 CTX-B-vel jelöltük. Konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a jelölt sejtfelszíni molekulák lokalizációját (A,B – a fluoreszcens és DIC csatorna kompozit képe), valamint a fotók analízisét követően összehasonlítottuk a Pearson-féle kolokalizációs koefficiens átlagértékeket (+ standard deviáció) (C).

A felvételeken jól látszik, hogy a rövid időtartamú ceramidstimulus hatására mind a GPI-horgonyzott raftmarker CD48, és a CTX-B-vel jelölt GM1 gangliosid valamint a TCR jelátviteli láncai által alkotott CD3 molekula is jellegzetes sejtfelszíni aggregátumokba koncentrálnak. A képek részletesebb vizsgálata során ugyanakkor nem volt kimutatható változás az illető molekulák kolokalizációjának mértékében.

#### **4.1.3. $\text{Ca}_v1.2$ L-típusú $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna, mint a ceramid egyik lehetséges „célpontja” T-limfocitákon?**

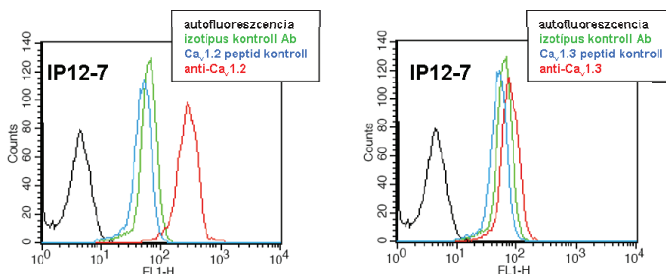
Az utóbbi évek egyik érdekes eredménye, hogy a korábban csak elektromosan stimulálható sejteken (ideg- és izomsejtek) leírt, 1,4-dihidropiridin (DHP) származékokra érzékeny ún. L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák ( $\text{Ca}_v1$ ) limfocitákban is kifejeződnek. Az mRNS- és fehérje szinten végzett vizsgálatok a csatornák több alegységét is kimutatták T- és B-sejtekben. Szintén a csatorna jelenlétére utal, hogy DHP típusú agonistákkal és antagonistákkal befolyásolható a limfociták  $\text{Ca}^{2+}$  válasza. A csatornák működésének szabályozásával kapcsolatban nincsenek egyértelmű vélemények, bizonyos adatok szerint a PKC szabályozása alatt állhat, feszültségfüggéséről limfocitákban ellentmondásos eredmények születtek (109-113). Fiziológias szempontból az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák limfocitákban betöltött szerepe egyelőre szintén nyitott kérdés (114).

Tekintve, hogy idegi eredetű  $\text{GH}_3$  tumorsejteken kimutatták, hogy exogén ceramiddel- illetve szfingomielinnel történő kezelés az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák aktivitását gátolja (115), megvizsgáltuk, hogy a modellrendszerünkben használt sejttypusokon szintén expresszálódnak-e L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák, és amennyiben azok funkcionálisan aktívaknak bizonyulnak, a ceramidstimulusok befolyásolják-e a működésüket.

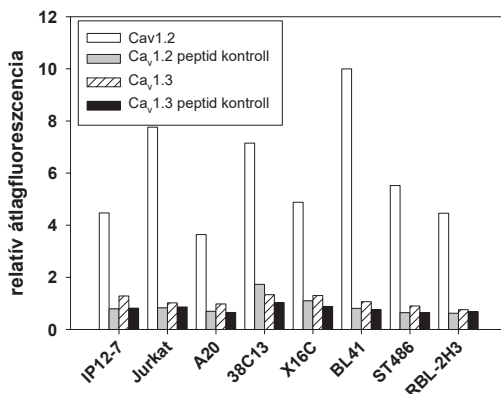
Vizsgálatainkba az IP12-7 egér és Jurkat human T-sejtek mellett bevontunk különböző differenciáltsági állapottal jellemezhető egér B-limfóma sejteket (A20-érett, 38C-13- éretlen, X16C-marginális zóna B-sejt), humán B-sejtvonalakat (BL41, ST486), valamint a patkány eredetű RBL-2H3 hiszosejtvonalat. Immunfluoreszcens jelzési technikát alkalmazva vizsgáltuk a  $\text{Ca}_v1.2$  és  $-1.3$  csatornaizomformák expresszióját az egyes sejttypusokon (8. ábra). Eredményeink szerint a  $\text{Ca}_v1.2$  izoforma jelentős mértékben expresszálódik a vizsgált valamennyi sejttypusban.



**A**



**B**



**8. ábra:** A  $\text{Ca}_v1.2$  és  $\text{Ca}_v1.3$  csatornák expressziós szintje T- és B-sejtvonalakon

A sejteket anti- $\text{Ca}_v1.2$  és anti- $\text{Ca}_v1.3$  ellenanyagokkal majd fluoreszcens másodlagos ellenanyagokkal jelöltük intracellulárisan. A minták fluoreszcencia intenzitását áramlási citometriával vizsgáltuk. Az ellenanyagok specifitásának ellenőrzésére szolgáló kontroll mintáknál az ellenanyagokat, a sejtekhez történő hozzáadás előtt, a nekik megfelelő kontrollpeptid feleslegben vett mennyiségével inkubáltuk együtt („peptid kontroll”). Az (A) ábrán az IP12-sejtek  $\text{Ca}_v1.2$  illetve  $\text{Ca}_v1.3$  expresszióját reprezentáló hisztogramsorozat látható. A (B) ábrán a különböző sejteken kapott  $\text{Ca}_v1.2$  és  $\text{Ca}_v1.3$  expressziós szintek láthatóak az izotípus kontroll ellenanyag esetén kapott értékekre normalizálva (relatív átlagfluoreszcencia).

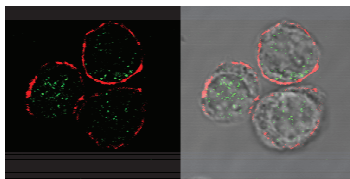
A konfokális mikroszkópiás vizsgálatok során a  $\text{Ca}_v1.2$  csatorna intracelluláris lokalizációjában sejttípustól függő eltéréseket tapasztaltunk (**9. ábra**). A csatorna bizonyos sejttípusok esetén elsősorban a plazmamembránban helyezkedik el (Jurkat T-sejt, RBL-2H3 hízósejt), ahol igen erős kolokalizációt mutat a raftmarker GM1 gangliozidokkal (koleratoxin-B festés). Más sejtekben ugyanakkor kimondottan intracelluláris festődést

figyelhettünk meg (IP12-7 T-sejt, B-sejtvonalak, primer egér lépsejtek). Az intracelluláris elhelyezkedés pontosabb meghatározása érdekében a sejtmagot (DRAQ5 vagy propidium-jodid) illetve az endoplazmatikus retikulum ryanodine-csatornáit (BODIPY FL-X ryanodine) is láthatóvá tettük fluoreszcens jelölés révén. IP12-7 és Jurkat sejteken, valamint primer egér lépsejteken jól látható, hogy az intracellulárisan elhelyezkedő  $Ca_v1.2$  elsősorban a sejtmagban lokalizálódik. A jelenség magyarázatául szolgálhat, hogy egy közelmúltban megjelent közlemény szerint idegsejtekben a  $Ca_v1.2$  csatorna intracellulárisan elhelyezkedő C-terminális régiója proteolízist követően a sejtmagba transzlokálódik és ott transzkripciósi faktorként közvetlenül szabályozni képes bizonyos gének átíródását (116).

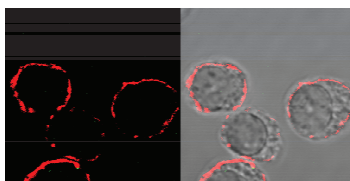
**A**

**IP12-7 (egér T)**

anti- $Ca_v1.2$   
CTX-B



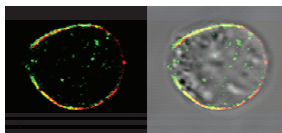
**$Ca_v1.2$  peptid kontroll**



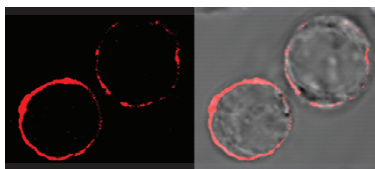
**B**

**Jurkat (humán T)**

anti- $Ca_v1.2$   
CTX-B

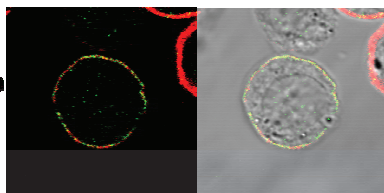


**$Ca_v1.2$  peptid kontroll**



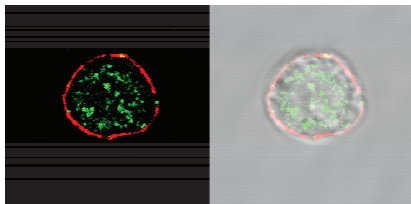
**C**

**RBL-2H3**  
(patkány hízósejt)  
anti-Cav1.2  
CTX-B



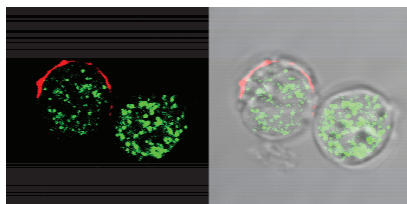
**D**

**38C13 (egér B)**  
anti-Cav1.2  
CTX-B



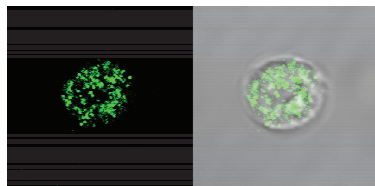
**E**

**A20 (egér B)**  
anti-Cav1.2  
CTX-B



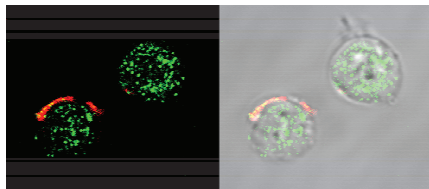
**F**

**X10C (egér B)**  
anti-Cav1.2  
CTX-B



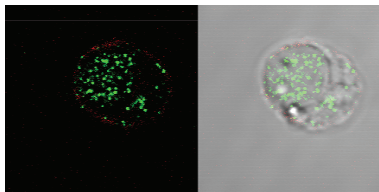
**G**

**BL41**  
(humán B)  
anti-Cav1.2  
CTX-B



H

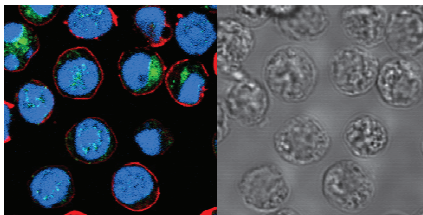
**ST486**  
(**humán B**)  
**anti-Cav1.2**  
**CTX-B**



I

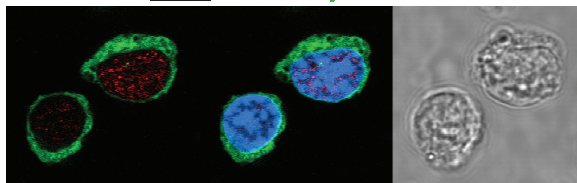
**egér lépsejt**

**anti-Ca<sub>v</sub>1.2**  
**CTX-B**  
**DRAQ5**



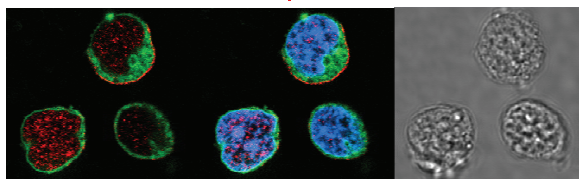
J

**IP12-7: anti-Cav1.2 ryanodine PI**



K

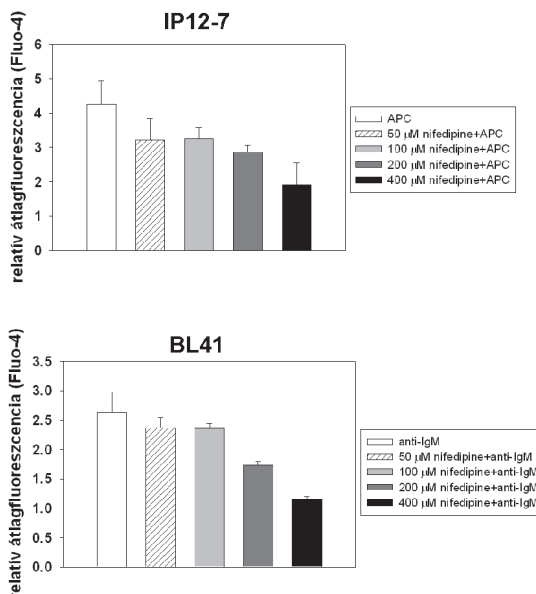
**Jurkat: anti-Ca<sub>v</sub>1.2 ryanodine PI**



#### 9. ábra: A Cav1.2 csatorna intracelluláris lokalizációja különböző sejtípusokon

A sejteket anti-Ca<sub>v</sub>1.2 ellenanyaggal és fluoreszcens másodlagos ellenanyaggal jelöltük intracellulárisan. Az ellenanyagok specificitásának ellenőrzésére szolgáló kontroll mintáknál az ellenanyagokat, a sejtekhez történő hozzáadás előtt, a nekik megfelelő kontrollpeptid feleslegben vett mennyiségével inkubáltuk együtt („peptid kontroll”). A raftokat Alexa 647-koleratoxin B-vel (CTX-B), a sejtmagi DNS-t DRAQ5-tel vagy propidium-jodiddal (PI) az endoplazmás retikulumot BODIPY FL-X ryanodine-nal festettük. A mintákat konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. (A) IP12-7 egér T-sejt, (B) Jurkat humán T-sejt, (C) RBL-2H3 patkány hízósejt, (D) 38C-13 éretlen egér B-sejt, (E) A20 érett egér B-sejt, (F) X16C marginális zóna B-sejt, (G) BL41 humán B-sejt, (H) ST486 humán B-sejt, (I) egér primer lépsejtek, (J) IP12-7, (K) Jurkat.

A  $\text{Ca}_v1.2$  csatorna funkcionális aktivitásának tesztelése érdekében megvizsgáltuk, hogy a TCR vagy BCR stimulációval kiváltott aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált befolyásolja-e az IP12-7 T-sejtek és a BL41 B-sejtek nifedipine-nel (L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló) történő előkezelése (10. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a nifedipine dóziszfüggő módon képes gátolni a kalciumszignált mindkét sejttípus esetében.

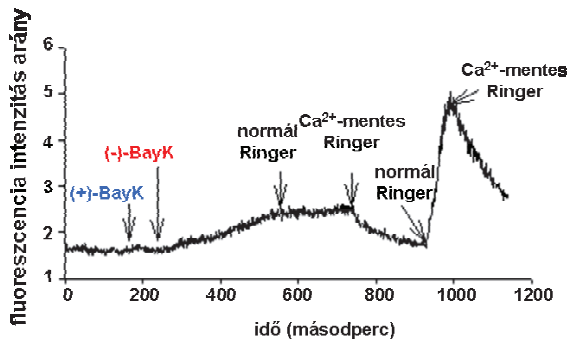


**10. ábra: A nifedipine hatása a TCR és a BCR által kiváltott aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálra**

Az IP12-7 T- és BL41 B-sejteket Fluo-4 kalciumfestékkel töltöttük fel, majd nifedipine-nel  $37^\circ\text{C}$ -on 10 percig különböző koncentrációban előkezeljük. Az alapel felvétele után az IP12-7 T-sejteket antigénpeptiddel feltöltött 2PK3 sejtekkel (APC), a BL41 sejteket anti-IgM ellenanyaggal aktiváltuk. Áramlási citometriával követtük az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változását, majd a  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz maximális amplitúdójának alapelre normalizált értékét (+ standard deviáció) oszlopdiagramon ábrázoltuk.

Egy másik kísérletben Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzitív fluoreszcens festékkel töltött IP12-7 T-sejteket kezeltünk a Bay K 8644 vegyület L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornákra antagonistá hatású (+)- illetve agonista (-) enantiomerjével, majd fluoreszcens mikroszkópián alapuló valós idejű detektáló rendszerben követtük a sejtek kalciumválaszát (11. ábra). Míg a (+)-Bay K

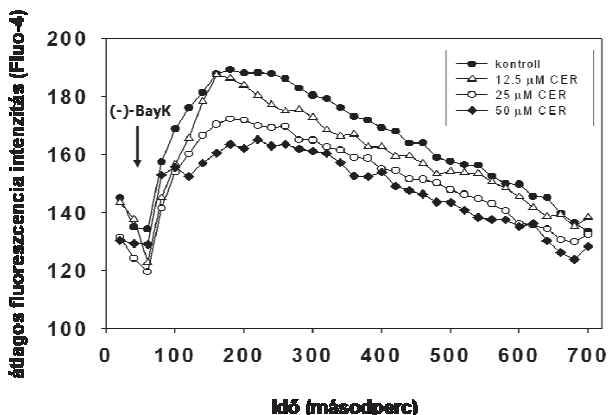
nem, addig a (-)-Bay K, extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétében, kalciumválaszt váltotta ki a sejtekben, jelezve, hogy az extracelluláris térből történő  $\text{Ca}^{2+}$ -influxról van szó.



11. ábra: Az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna agonista (-)-Bay K 8644 hatása az IP12-7 T-sejtek intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentrációjára

Az IP12-7 T-sejteket Fura-2 kalciumfestékkel töltöttük fel, majd 100  $\mu\text{M}$  (+)- és (-)-Bay K 8644-gyel kezeltük perfúziós kamrában. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változását fluoreszcens mikroszkópián alapuló valós idejű detektáló rendszerben követtük nyomon.

A fentiek alapján tehát kimutattuk, hogy az IP12-7 T-sejtekben és a BL41 B-sejtekben funkcionálisan aktív  $\text{Ca}_v1.2$  csatornák expresszálódnak. A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a ceramidszignálok milyen hatással vannak a csatorna működésére. Fluo-4 festékkel töltött IP12-7 T-sejteket 10 percig  $\text{C}_2$ -ceramiddal kezelve azt tapasztaltuk, hogy a sejteket előzetesen érző ceramidstimulus koncentrációfüggő módon gátolni képes a (-)-Bay K 8644 által indukált kalciumválaszt (12. ábra).



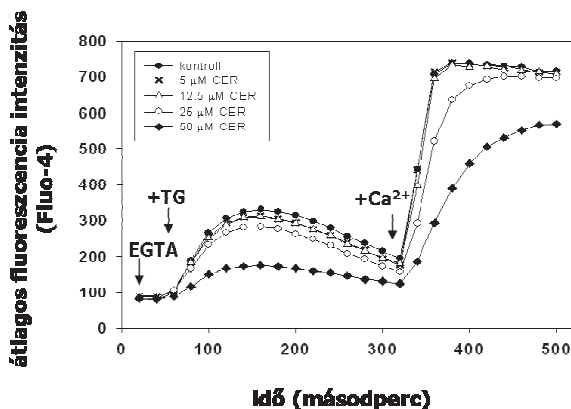
12. ábra: Az exogén  $C_2$ -ceramid kezelés hatása a (-)-Bay K 8644 által indukált kalciumszignálra IP12-7 sejtekben

Az IP12-7 T-sejteket Fluo-4 kalciumfestékkel töltöttük fel, majd  $C_2$ -ceramiddal (CER) különböző koncentrációban 10 percig  $37^\circ\text{C}$ -on kezeltünk. A sejtek mosását és az alapjel felvételét követően  $100 \mu\text{M}$  (-)-Bay K 8644-gyel aktiváltuk a sejteket. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változását áramlási citometriával követtük nyomon.

#### 4.1.4. A ceramidszignálok hatása az intracelluláris $\text{Ca}^{2+}$ -raktárakra

Munkacsoportunk korábbi eredményei szerint az apoptózishoz nem vezető ceramidstimulusok gátolják a T-sejtek antigénspecifikus aktivációja során az intracelluláris raktárakból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást valamint az ezt követő, extracelluláris térből történő  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot (104). Jurkat T-sejtek fluoreszcens ceramidanalóggal történő inkubációja esetén (3. ábrán) láthattuk, hogy a plazmamembránban felhalmozódott ceramidmolekulák gyorsan internalizálódnak, néhány percen belül elérik az intracelluláris membránkompartmenteket. Ezeket a megfigyeléseket alapul véve megvizsgáltuk, hogy a T-sejteket érő ceramidszignálok hogyan befolyásolják az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárként funkcionáló endoplazmás retikulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmát. A kísérletek során a Fluo-4 festékkel feltöltött IP12-7 T-sejteket extracelluláris EGTA jelenlétében  $C_2$ -ceramiddal, majd  $100 \text{ nM}$  thapsigarginnal (TG) kezeltük. A thapsigargin az endoplazmás retikulum membránjában található  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázok, az ún. SERCA pumpák blokkolószer. Hatására az endoplazmás retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalma a citoplazma irányába történő passzív iontranszportnak köszönhetően csökken, ezt követően pedig, amennyiben az extracelluláris térben  $\text{Ca}^{2+}$  is jelen van, a plazmamebránon keresztüli  $\text{Ca}^{2+}$ -influx is kialakul. A sejtek

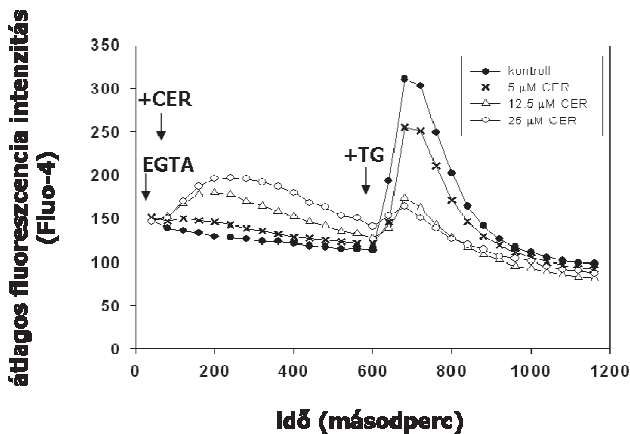
kalciumszignálját áramlási citometriával követtük nyomon. Annak érdekében hogy a TG által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -influx amplitudóját is lássuk, a mérési idő felénél visszapótoltuk az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -mennyiséget. Eredményeink szerint a sejteket érő rövid időtartamú (10 perces) ceramidstimulusok gátolják mind a TG-szenzitív belső raktárakból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást, mind az azt követő extracelluláris térből származó  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot (**13. ábra**).



**13. ábra A ceramidstimulusok hatása a T-sejtek thapsigarginnal kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -szignáljára**  
A Fluo-4 festékkel feltöltött IP12-7 T-sejteket 1 mM EGTA jelenlétében  $\text{C}_2$ -ceramiddal (CER) kezeltük 10 percig 37°C-on, majd áramlási citometriával vizsgáltuk a sejtek 100 nM thapsigarginra (TG) adott kalciumválasztát. A mérési idő felénél 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -ot adtunk a sejtekhez, melynek hatására jól elkülöníten vizsgálható a extracelluláris térből történő  $\text{Ca}^{2+}$ -influx nagysága is.

Annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy a ceramidkezelés hatására kialakuló, az intracelluláris raktárakból történő  $\text{Ca}^{2+}$ -efflux amplitudójában tapasztalt csökkenést az ER  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmának megváltozása vagy valamilyen más mechanizmus okozza-e, az IP12-7 sejtek ceramida adott kalciumválasztát is megvizsgáltuk EGTA jelenlétében, majd a mérés során TG-nal is aktiváltuk a sejteket (**14. ábra**). Utóbbi eredményünk alapján megállapíthatjuk, hogy a ceramid önmagában képes  $\text{Ca}^{2+}$ -effluxot kiváltani az intracelluláris raktárakból, amelyek egyben TG-szenzitívnek is bizonyultak.



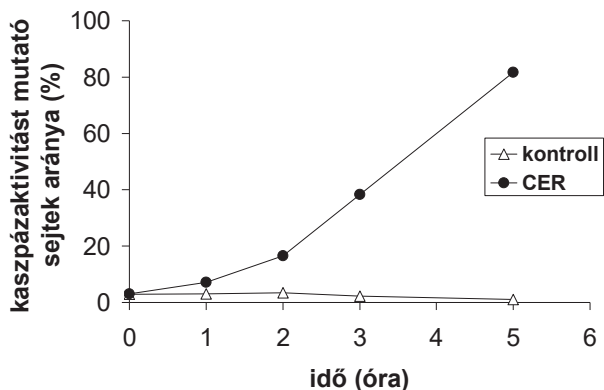


**14. ábra A ceramidstimulusok hatása a T-sejtek thapsigargin-szenzitív intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárainak kalciumtartalmára**  
Az áramlási citometriás vizsgálat során a Fluo-4 festékkel feltöltött IP12-7 T-sejteket 1 mM EGTA jelenlétében  $\text{C}_2$ -ceramiddal (CER) kezeltük. A mérési idő felénél 100 nM thapsigargin (TG) adtuk a sejtekhez.

#### **4.1.5. A hosszabb időtartamú ceramidszignálok hatása a kaspázkaskád és az apoptózis mitokondriális útvonalának aktivációjára, időbeli viszonyaira**

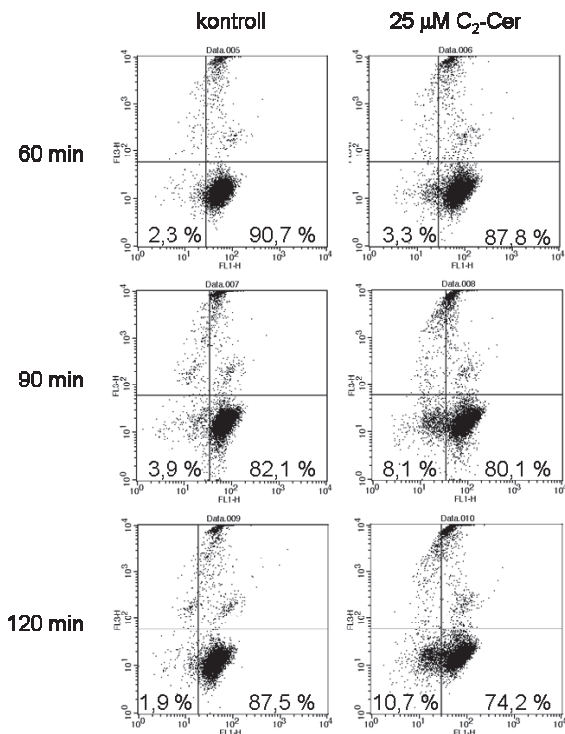
Az IP12-7 sejteken alapuló modellrendszerünkben kapott eredmények szerint a ceramid apoptózist indukáló hatása a stimulus erőssége és időtartama által meghatározott T-sejtekben. A ceramid másodlagos jelátviteli molekulaként számos sejthalált indukáló faktor esetében kiegészítő szerepet játszik az apoptózis mitokondriális útvonalának elindításában. Fokozza a GD3 gangliozidok szintézisét és mitokondriumba történő vezikuláris transzportját, ennek révén hozzájárul a mitokondriális membránpórusok kialakulásához és különböző proapoptotikus faktorok felszabadulásához, amelyek azután elősegítik az effektor kaspázok (kaspáz-3, -6, -7) aktiválódását. Az irodalomban ugyanakkor nincs teljes egyetértés a tekintetben, hogy a ceramid által indukált apoptózis során milyen szerepet töltenek be az effektor kaspázok aktiválódását időben megelőző iniciátor kaspázok a mitokondriális membrán permeabilizálódásához vezető folyamatban, illetve hogy a kaspázaktivitás milyen időbeli összefüggést mutat a mitokondriális membrán permeabilizálódásának kialakulásával (117-121). Így célunk volt a ceramid kaspázaktivitásra gyakorolt hatásának illetve a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének időbeli viszonyait feltárni.

Az IP12-7 sejteket 25  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -ceramiddal inkubáltuk 37°C-on különböző ideig, majd a sejtek kaspázaktivitását  $\text{Asp}_2$ -Rhodamine 110 fluorogén, általános kaspázszubsztrát segítségével (15. ábra), a mitokondriális membránpotenciál csökkenését a karbocianin-típusú, pozitív töltésű  $\text{DiOC}_6(3)$  fluoreszcens próbával (16. ábra) vizsgáltuk áramlási citometriás mérés során, a propidium-jodidra negatív sejtpopuláción belül.



**15. ábra A ceramid által kiváltott kaspázaktiváció IP12-7 sejtekben**

Az IP12-7 T-sejteket 25  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -ceramiddal illetve kontrollként a ceramidnak megfelelő mennyiségű DMSO-val inkubáltuk 37°C-on  $\text{CO}_2$  termosztátban. Adott idő elteltével a sejteket PBS-ben mostuk, majd 50  $\mu\text{M}$   $\text{Asp}_2$ -Rhodamine 110 fluorogén, általános kaspázszubsztrát jelenlétében további 30 percig inkubáltuk 37°C-on. Újabb mosás és 1  $\mu\text{g/ml}$  propidium-jodid hozzáadását követően áramlási citometriával vizsgáltuk a propidium-jodidra negatív sejtpopulációban a Rhodamine 110 pozitív sejtek százalékos arányát.



**16. ábra: A mitokondriális membránpolarizáció megjelenése a C<sub>2</sub>-ceramid által indukált apoptózis során IP12-7 sejtekben**

Az IP12-7 T-sejteket 25 μM C<sub>2</sub>-ceramiddal illetve kontrollként a ceramidnak megfelelő mennyiségű DMSO-val inkubáltuk 37°C-on CO<sub>2</sub> termosztátban. Adott időt elteltével a sejteket PBS-ben mostuk, majd 100 nM DiOC<sub>6</sub>(3) pozitív töltésű lipofil, potenciálszenzitív fluoreszcens festékkel festettük. 1 μg/ml propidium-jodid hozzáadását követően áramlási citometriával vizsgáltuk a csökkent mértékű DiOC<sub>6</sub>(3) festődést (a mitokondriális membránpotenciál csökkenése) mutató sejtek százalékos arányát a propidium-jodidra negatív sejtpopulációban.

Eredményeink szerint 25 μM exogén C<sub>2</sub>-ceramidot alkalmazva megközelítőleg azonos idő után (kb. 2 óra) jelenik meg mind a kaspázaktivitás, mind a mitokondriális membránpotenciál csökkenése (csökkent mértékű DiOC<sub>6</sub>(3) festődés). Vagyis a ceramidindukált kaspázaktiváció és a mitokondriális membránpermeabilizálódás megjelenése között nem lehet időbeli sorrendet felállítani az IP12-7 T-sejtek esetén, amely azt valószínűsíti, hogy a ceramid által indukált apoptózis során a kaspázaktivitás minden

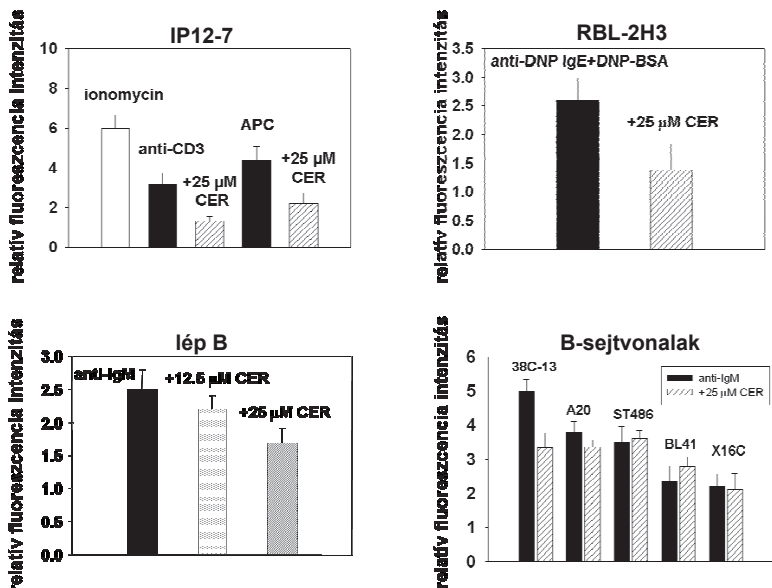
bizonytal a mitokondrium permeabilizálódásának következtében jelenik meg, ahogyan az a kaspáz-9 aktivációja kapcsán is ismeretes.

## **4.2. Mennyire tekinthető általánosnak a ceramid aktivációs $\text{Ca}^{2+}$ -szignált illetve a sejthalált érintő szabályozó hatása különböző érettségi állapotú és típusú immunsejtekben?**

### **4.2.1. A ceramidszignálok aktivációs $\text{Ca}^{2+}$ -szignálra gyakorolt hatása különböző immunsejtekben**

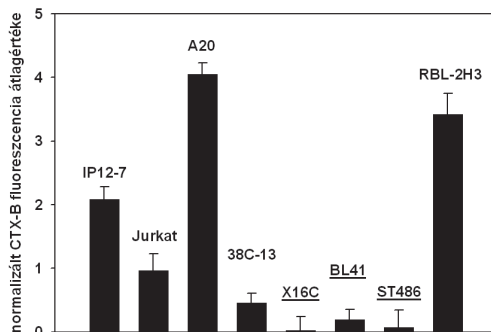
Munkacsoportunk IP12-7 T-sejteken kapott korábbi eredményei szerint az apoptózishoz nem vezető, rövid időtartamú, mérsékelt ceramidstimulusok gátolják az antigénspecifikus aktiváció során kialakuló  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált. Ez a megfigyelés felvetette a kérdést, hogy a nem apoptotikus ceramidszignálok jelenthetnek-e egy általános érvényű sejtaktivációt szabályozó mechanizmust más, immunológiai szempontból kiemelt jelentőségű sejtípus kapcsán is.

A kérdés megválaszolásához különböző eredetű és érettségi állapotú B-sejtek valamint egy patkány hízósejtvonal antigénkötő- illetve Fc $\epsilon$ -receptorain keresztül kiváltott aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálját vizsgáltuk meg 10 perces  $\text{C}_2$ -ceramiddal történő előkezelést követően (17. ábra). Az eredmények alapján az egér eredetű primer lép B-sejtek és az RBL-2H3 hízósejtek aktivációs kalciumválaszt egyaránt gátolta a ceramid. Hasonló hatást figyelhettünk meg az éretlen fenotípusú 38C-13 valamint az érett jellegű A20 B-sejtek esetében is. Utóbbiak közül a 38C-13 jellemzően nagyobb érzékenységet mutatott a nem apoptotikus ceramidszignálokra. Ezzel szemben a marginális zóna fenotípusú egér eredetű X16C, valamint a humán érett ST486 és BL41 B-sejtek rezisztensnek mutatkoztak a ceramid  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálra gyakorolt gátló hatását tekintve. Érdekes módon ezen három sejtípus sejt felszíni raftexpressziója (GM1 gangliozid-CTX-B festés) extrém módon alacsonynak bizonyult a ceramidra érzékeny sejtípusokéhoz képest (18. ábra). Elképzelhető, hogy ezen utóbbi megfigyelés összefüggésbe hozható a sejtek kalciumválaszt érintő gátló hatással, hiszen a plazmamembránban a ceramid szfingomielinből történő felszabadulását követően képes membránszerkezeti változásokat illetve a raftok aggregációját kiváltani, amely hozzájárulhat a ceramid sejtaktivációra és sejthalálra gyakorolt hatásaihoz.



17. ábra: Az apoptózist nem indukáló (rövid időtartamú, mérsékelt) ceramidstimulusok hatása a különböző immunsejtek antigén által indukált aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignáljára

A sejteket Fluo-3 kalciumfestékkel töltöttük fel, majd  $\text{C}_2$ -ceramiddal (CER) különböző koncentrációban 10 percig  $37^\circ\text{C}$ -on előkezeltük. A sejtek mosását és az alajpel felvételét követően az IP12-7 T-sejteket  $50 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3-mal vagy antigén peptiddel feltöltött 2PK3 sejtekkel (APC), a DNP-specifikus IgE-vel szenitizált RBL-2H3 hiszösejteket  $50 \text{ ng/ml}$   $\text{DNP}_{11}$ -BSA konjugátummal, a eger B-sejteket (primer lép B-sejtek, 38C-13, A20, X16C)  $3 \mu\text{g/ml}$  anti-eger IgM ( $\text{Fab}'_2$  ellenanyaggal), a humán B-sejteket (ST486, BL41)  $0.5 \mu\text{g/ml}$  anti-humán IgG+IgM ( $\text{Fab}'_2$  ellenanyaggal) aktiváltuk. Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció változását áramlási citometriával követtük nyomon. A  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz maximális amplitudójának alapjelre normalizált értékét (+ standard deviáció) oszlopdiagramon ábrázoltuk.

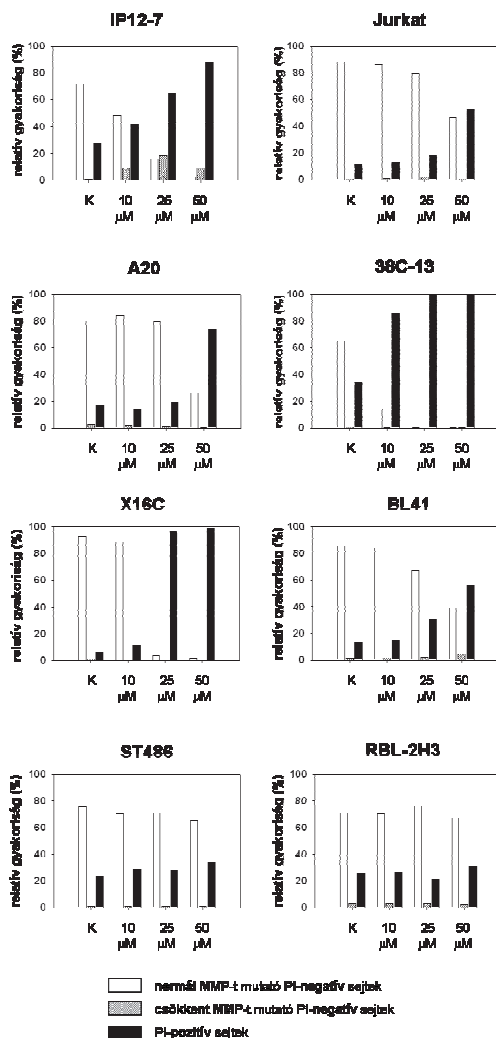


**18. ábra: A különböző immunsejtek raft / GM1 gangliozid expressziójának összehasonlítása**  
A sejteket Alexa 488 CTX-B-vel jelöltük jégén, majd a mintákat áramlási citometriával vizsgáltuk. Az ábrán a CTX-B fluoreszcencia intenzitás átlagának sejtméretre („forward scatter” szignál) normalizált értékét (+ standard deviáció) ábrázoltuk.

#### 4.2.2. A hosszabb időtartamú, sejthalált indukáló ceramidszignálok hatása különböző immunsejtekre

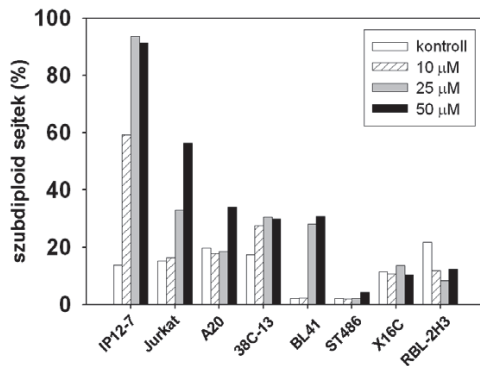
Korábbi eredményeink szerint az erős (nagy koncentráció), hosszú ideig fennálló ceramidszignálok a T-sejtek fokozott mértékű apoptózisát indukálják. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk a különböző immunsejtek ceramid által indukált sejthalálra mutatott érzékenységét. A sejteket különböző koncentrációban  $C_2$ -ceramiddal kezeltük 6 órán át, majd ezt követően a mitokondriális depolarizáció (apoptózis) és a spontán propidium-jodid pozitivitás (nekrózis) (**19. ábra**) valamint a DNS-fragmentáció mértéke (apoptózis) (**20. ábra**) alapján jellemztük az egyes sejt típusoknál bekövetkező változásokat.

A sejthalált indukáló ceramidszignálokra adott választ tekintve ez a vizsgálat is jellegzetes eltéréseket mutatott ki a különböző immunsejtek között. Míg a T-sejtek (IP12-7, Jurkat) nagy százalékában az apoptózisra jellemző csökkent mitokondriális membránpotenciál illetve DNS-fragmentáció volt jellemző, addig az éretlen fenotípusú 38C-13 és a marginális zóna jellegű X16C B-sejtekre az erőteljes nekrotikus (spontán propidium-jodid felvétel) sejthalál volt jellemző. Érdekes módon az érett fenotípusú A20 B-sejtek, a humán ST486 és BL41 B-sejtek és különösen az RBL-2H3 hízósejtek jellegzetes rezisztenciát mutattak a ceramid által közvetített sejthalállal szemben.



19. ábra: A különböző immunsejtek hosszú időtartamú, sejthalált indukáló ceramidszignállokra adott válasza

A sejteket 6 óráig különböző koncentrációban  $C_2$ -ceramiddel kezeltük  $37^\circ\text{C}$ -on  $\text{CO}_2$  termosztátban, majd DiOC6(3) és propidium-jodid (PI) festést követően áramlási citométer segítségével vizsgáltuk a sejthalállal összefüggő jellegzetes változásokat. MMP – a mitokondriális membránpotenciál. A PI-pozitivitás nekrozisra utal.



**20. ábra: Az apoptotikus ceramidszignálok DNS-fragmentációt indukáló hatása különböző immunsejtekben**

A sejteket 6 óráig 10, 25 és 50  $\mu\text{M}$   $\text{C}_2$ -ceramiddal kezeltük  $37^\circ\text{C}$ -on  $\text{CO}_2$  termosztátban, majd a mintákat propidium-jodid tartalmú DNS-extraháló hipotóniás citrátpufferben inkubáltuk. A DNS-fragmentáció és a DNS-extrakció eredményeként megjelenő csökkent DNS-tartalmú ún. szubdiploid sejtpopuláció százalékos arányát áramlási citometriás vizsgálat során határoztuk meg.

### 4.3. Az ösztrogén T- és B-sejtekre gyakorolt gyors, nem genomiális hatásai

A szteroid hormonok közé tartozó ösztrogén ( $17\beta$ -ösztradiol, E2) kitüntetett szabályozó szereppel bír az adaptív immunrendszer sejtjei elemeinek fejlődésében, érésében, az immunválasz kialakulásában. Munkacsoportunk korábban az ösztrogén T-sejtektől függő és T-sejtektől független antigénre adott immunválaszra gyakorolt hatását vizsgálta egér állatmodellen. A kapott eredmények szerint az ösztrogén pozitívan szabályozza a B-sejtek T-dependens antigénre adott ellenanyagválasztát.

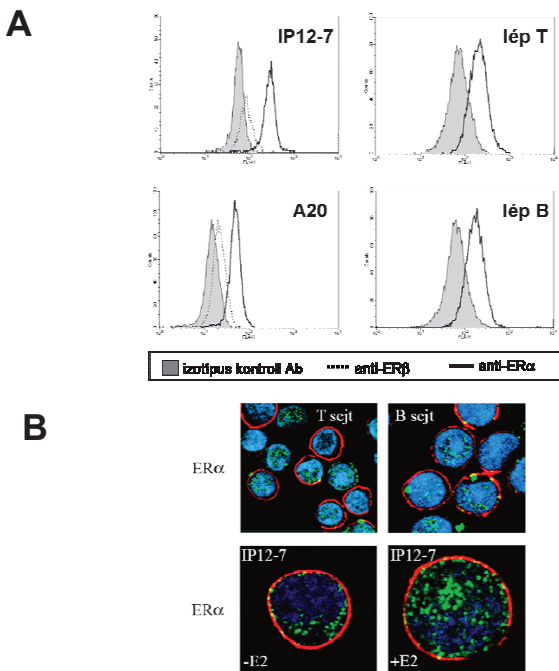
#### 4.3.1. A klasszikus intracelluláris valamint a membrán ösztrogénreceptorok expressziója T- és B-limfocitákon

Az ösztrogén ellenanyagtermelést fokozó hatása közvetlenül a B-sejtekre gyakorolt hatás révén illetve a  $T_H2$ -sejtek közvetítésével valósulhat meg. Az ösztrogén alapvetően két módon tudja befolyásolni a T- és B-sejtek funkcióját: egyrészt a jól ismert *klasszikus* intracelluláris receptorain ( $\text{ER}\alpha$  és  $\beta$ ) keresztül, amelyek révén közvetlenül hathat bizonyos gének transzkripciójára, másrészt az intracelluláris jelátviteli pályákra kifejtett



gyors, transzkripcióhoz csak közvetve vezető ún. *nem klasszikus hatásai* révén. A szakirodalom szerint az utóbbiakért részben az intracelluláris receptorok, valamint az eddig még nem meggyőzően azonosított membrán receptor(ok) tehetők felelőssé.

Ezen ismeretekből kiindulva első lépésben megvizsgáltuk a klasszikus citoplazmatikus ER $\alpha$  és  $\beta$  expresszióját IP12-7 T-sejtekben és egér lépből izolált primer T-sejteken valamint az összehasonlíthatóság kedvéért A20 egér B-sejtvonalon és primer lép B-sejteken is (**21. ábra**). Áramlási citometriás és konfokális mikroszkópos eredményeink szerint az ER $\alpha$  mind T, mind B-sejtekben jelentős expressziót mutat, szemben az ER $\beta$  izoformával. A főleg citoplazmatikus és sejtmagi elhelyezkedésű ER $\alpha$  funkcionális aktivitását szintén sikerült igazolnunk: IP12-7 sejtekben 100 nM E2-vel történő előkezelés hatására a receptor fokozott sejtmagi transzlokációja figyelhető meg (**21/B. ábra**).

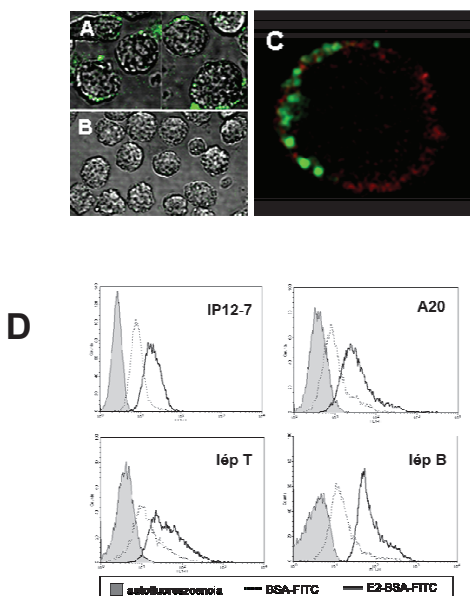


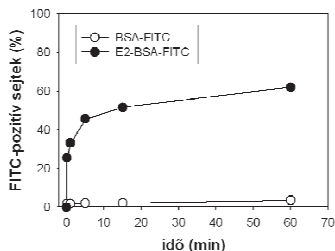
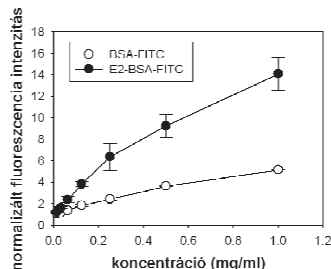
**21. ábra** A klasszikus ER $\alpha$  and ER $\beta$  receptorok expressziója egér T- és B-sejtekben

A sejtfelszíni raftok Alexa 647 CTX-B-vel történő jelölését követően a sejteket intracellulárisan anti-ER $\alpha$  és anti-ER $\beta$  ellenanyagokkal majd rájuk specifikus fluoreszcens másodlagos ellenanyagokkal jelöltük. A sejtmag jelölésére DNS-

Specifikus DRAQ5 festéket használtunk. (A) A vizsgált sejttípusok ER $\alpha$  és ER $\beta$  expressziójának áramlási citometriás vizsgálata. (B) Az ER $\alpha$  lokalizációjának konfokális mikroszkópiás vizsgálata. Az ER $\alpha$  sejtmagi transzlokációját az IP12-7 sejtek 100 nM E2-vel 1 órán át történő előkezelésével indukáltuk. Piros: Alexa 647-CTX-B, zöld: anti-ER $\alpha$ , kék: DRAQ5.

A szakirodalomban a membrán ösztrogénreceptor(ok) jelenlétének illetve funkciójának tanulmányozására széles körben alkalmazzák a 17 $\beta$ -ösztadiol marha szérum albuminnal (BSA) kovalensen konjugált, ezáltal membránimpermeábilis formáját (E2-BSA illetve E2-BSA-FITC). Az általunk vizsgált primer T- és B-sejteket illetve IP12-7 T- és A20 B-sejteket E2-BSA-FITC-cel történő együttinkubálását követően plazmamembránban lokalizált ösztrogénkötő helyeket sikerült kimutatnunk (**22. ábra**). Az IP12-7 sejteken végzett kísérletek alapján az E2-BSA-FITC kötődés dózis- és időfüggésének telítési jellege valamint a BSA-FITC esetében tapasztalt elhanyagolható mértékű háttérjel a kötődés specifikusságára és viszonylag gyors, receptorközvetített voltára utal.



**E****F**

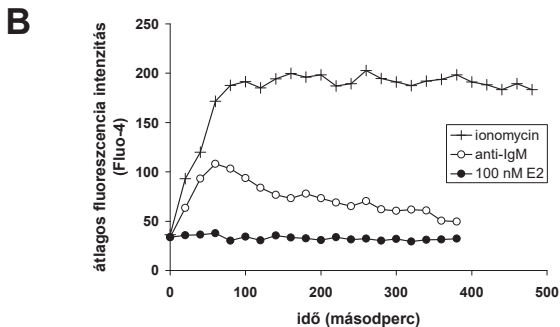
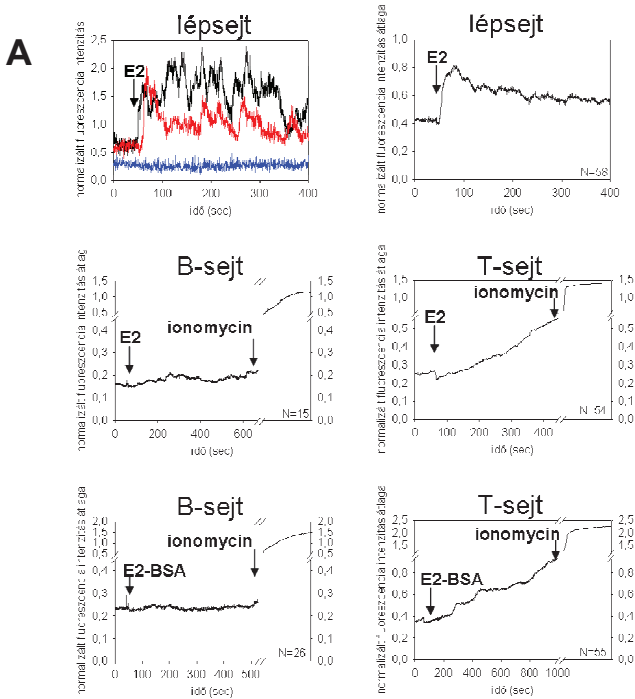
**22. ábra: A BSA-val konjugált 17 $\beta$ -ösztadiol (E2-BSA) kötődése egér T- és B-sejtekhez**

Az E2-BSA-FITC sejtfelszíni kötődése lép T-sejtekhez (A), valamint a BSA-FITC háttérjele (B), konfokális mikroszkópia (DIC+fluoreszcens kép). (C) Az E2-BSA-FITC kötődése (zöld) anti-B220 PE/Cy5 ellenanyaggal (vörös) jelölt lép B-sejten. (D) Az E2-BSA-FITC kötődésének áramlási citometriás vizsgálata IP12-7, A20, primer lép T- és B-sejteken. (E) 1 mg/ml koncentrációban alkalmazott E2-BSA-FITC illetve BSA-FITC sejtfelszíni kötődésének időfüggése IP12-7 sejteken. (F) Az E2-BSA-FITC illetve BSA-FITC sejtfelszíni kötődésének koncentrációfüggése 15 perces jelölést követően IP12-7 sejteken (autofluoreszcenciás jelle normalizált fluoreszcencia intenzitás átlagértéke + standard deviáció).

#### 4.3.2. Az ösztrogén intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációra gyakorolt hatása T- és B-sejteken

Irodalmi adatok utalnak arra, hogy a MCF7 tumorsejtekben és limfocitákban ösztrogén hatására gyors emelkedés figyelhető meg a citoplazmatikus szabad Ca<sup>2+</sup>-szintben (121-123).

E2-vel és E2-BSA-val végzett kísérleteink szerint, míg T-sejtekben az ösztrogén mindkét formája lassú, oszcilláló, hosszan fenntartott kalciumválaszt indukál, addig lép B-sejtekben nem figyelhető meg ez a jelenség. A B-sejtekben anti-IgM ellenanyaggal kiváltható aktivációs Ca<sup>2+</sup>-szignál bizonyítja, hogy ezen sejtekben is működőképes a intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-mobilizálásért felelős jelátviteli útvonal, azonban ezt, szemben a T-sejtekkel, B-limfocitákban nem aktiválja az ösztrogén (23. ábra).

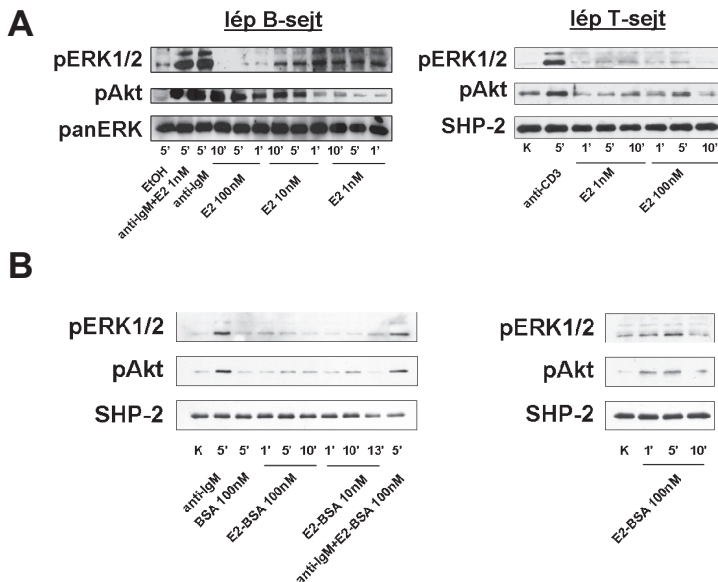


**23. ábra: Az ösztrogén által indukált  $\text{Ca}^{2+}$ -szignál T- és B-sejtekben**

(A) Egér lépsejtek valamint szeparált lép T- és B-sejtek kalciumválasza 100 nM E2 illetve E2-BSA kezelést követően (konfokális mikroszkópia). A felső sor bal oldali grafikonján három egyedi lépsejt kalciumgörbéje illetve a sejtválasz intenzitásának sejtszintű heterogenitása figyelhető meg. Az (A) ábra további grafikonjai a kalciumválasz több sejtre (N) kiátlagolt görbéi lettek feltüntetve. (B) A szeparált lép B-sejtek anti-IgM ellenanyaggal kiváltott kalciumválasza (áramlási citometria).

#### 4.3.3. Az ösztrogén Akt- és ERK-foszforilációra gyakorolt hatása T- és B-limfocitákban

Az ösztrogén gyors, nem klasszikus hatásai közé tartozik az intracelluláris kinázaskaszád aktiválása. Kísérleteink során primer lép T és B-sejteken vizsgáltuk az E2-vel valamint E2-BSA-val történő stimulálás hatását az Akt és ERK1/2 kinázok foszforilációjára. Eredményeink szerint az E2 idő- és dózisfüggő módon képes indukálni az Akt és ERK kinázok foszforilációját T- és B-sejteken, utóbbiaknál azonban a hatás sokkal kifejezettebben jelentkezett (**24. ábra**). További megfigyelésünk volt, hogy B-sejteknél a magasabb koncentrációban (100 nM) alkalmazott E2 az Akt-, az alacsonyabb koncentrációtartomány az ERK1/2 foszforilációjának kedvezett jobban. Nem volt észlelhető különbség a B-sejtek anti-IgM-mel illetve ösztrogénnel és anti-IgM-mel együttesen történő stimulációja esetén. A membrán ösztrogénreceptor Akt- és ERK-foszforilációban játszott szerepének tisztázására a sejteket 100 nM E2-BSA-val stimuláltuk. Érdekes módon azt találtuk, hogy míg T-sejteken mind az Akt, mind az ERK1/2 foszforiláció fokozódott E2-BSA hatására, addig B-sejteken gyakorlatilag nem tapasztaltunk változást. Utóbbi jelenség alapján úgy tűnik, hogy az ösztrogén B-sejteken elsősorban az intracelluláris ER $\alpha$  közreműködése révén, míg T-sejteken inkább a membrán ösztrogénreceptoron keresztül fejti ki a hatását.

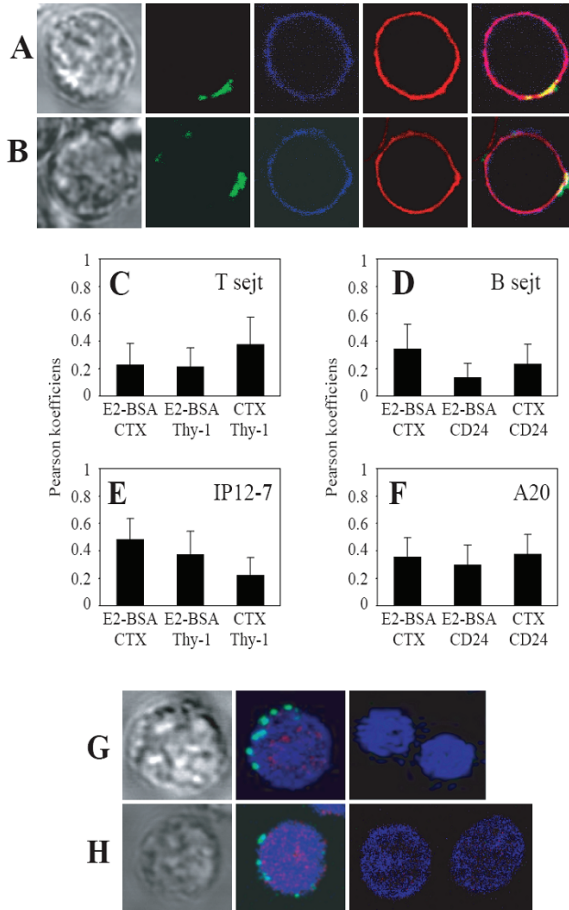


**24. ábra: Az ösztrogén hatása az Akt és ERK1/2 kinázok foszforilációjára**

Szeperált lép B- (bal oldali gélképek) és T-sejteket (jobb oldali gélképek) E2-vel (A) illetve E2-BSA-val (B) kezeltünk, majd sejtlizátumot készítettünk a mintákból. Az Akt és ERK foszforilációját SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és Western blot technika segítségével vizsgáltuk. A minták azonos fehérjetartalmáról anti-pan-ERK és anti-SHP-2 jelölés révén bizonyosodtunk meg. K: kezeletlen kontroll minta, EtOH: etanol (az ösztrogén oldószerkontrollja).

**4.3.4. A membrán ösztrogénreceptor és a lipid raftok valamint az intracelluláris ER $\alpha$  receptorok közti kolokalizációs viszonyok kérdése**

Az ösztrogén gyors, nem klasszikus hatásainak közvetítésében fontos szerepet játszanak a membrán ösztrogénreceptorok. Bár ezek egyértelmű „kiléte” egyelőre nem tisztázott, a sok rendelkezésre álló irodalmi adat ellenére sem, immunfluoreszcens jelölést követő konfokális mikroszkópiás vizsgálataink mindenesetre fényt derítettek rá, hogy az E2-BSA-FITC-cel detektált membrán ösztrogénreceptorok viszonylag nagyfokú kolokalizáltságot mutatnak a raftmarker GM1 gangliozidokkal és a GPI-horgonyzott Thy-1 (T-sejteken) illetve CD24 molekulákkal (B-sejteken) (25. ábra). Az intracelluláris ER $\alpha$  receptorok immunfluoreszcens jelölése alapján megállapíthattuk, hogy ezek nem azonosak az E2-BSA-FITC által kijelölt sejtfelszíni ösztrogénkötő helyekkel.



## 25. ábra: A membrán ösztrogénreceptorok lokalizációjának vizsgálata

(A, B) A bemutatott reprezentatív konfokális mikroszkópos felvételek a membránkötött E2-BSA-FITC (zöld) kolokalizációját szemléltetik a GM1 gangliozidokkal (Alexa 555 CTX-B, piros) illetve a B-sejtek ((A), Alexa 647-anti-CD24, kék) és T-sejtek ((B), Alexa 647-anti-Thy-1, kék) GPI-horgonyzott fehérjemarkereivel. (C-F) A sejttípusonként 80-100 képterület alapján számolt Pearson-féle kolokalizációs index átlagértékek (+ standard deviáció) analízise IP12-7, A20, lép T- és B-sejtek esetén. (G, H) Reprezentatív felvételek lép B- (G) és lép T-sejtekről (H) az E2-BSA-FITC (zöld) és az anti-ER $\alpha$  (piros) egymáshoz viszonyított elhelyezkedése kapcsán (kék: sejtmagi DNS-DRAQ5). A (G) és (H) sorok jobb szélső fotóin a kontroll BSA-FITC-cel (zöld) és az anti-ER $\alpha$  izotípus kontroll ellenanyagával (piros) kapott eredmény látható.

## 5. Az eredmények megvitatása

A szfingomielinázok aktivációja a sejteket érő számos apoptotikus/stressz stimulus esetén megfigyelt általános jelenség, amely egy sokrétű intracelluláris jelátviteli mediátor és szabályozó molekula, a ceramid képződéséhez vezet. A ceramid membránakkumulációjának az adott sejttípusra gyakorolt hatása azonban annak jelátviteli molekula készletétől, azok expressziójától is erősen függ. A T-sejtek esetén eddig a ceramid szabályozó funkcióinak több oldalát sikerült megismerni, mint pl. néhány korai, a membrán szerkezetére gyakorolt hatása, a sejtciklus, vagy a proliferáció szabályozása. A ceramid ugyanakkor a mitokondriumon keresztül lezajló, ún. foszfolipid sejthalál jelpályának is fontos eleme. A T-sejtekre gyakorolt eddig megismert ceramid-hatások összegzése (125) egy meglehetősen komplex és helyenként ellentmondásos képet vázol fel. Ez utóbbi feltehetően abból adódik, hogy a sejtek jelátviteli folyamatai és válasza érzékenyen függ a ceramid koncentrációjától, ill. a ceramid képződését kiváltó szfingomielináz aktiváló jelek hosszától.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatai alapján a ceramid T-sejtekre gyakorolt apoptotikus hatása a szignál erőssége és időtartama által szigorúan meghatározott A mérsékelt, rövidebb időtartamú, apoptózist nem indukáló ceramidstimulusok gátolni képesek a T-sejt aktiváció korai és késői jelátviteli lépéseit. Az aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált érintő gátló hatással kapcsolatban sikerült azonosítanunk néhány lehetséges okot, így pl. membránszerkezeti hatások, plazmamembrán-depolarizáció, a  $\text{K}_v1.3$  feszültségfüggő  $\text{K}^+$ -csatornára kifejtett gátló hatás. A szabályozás háttérmechanizmusának részleteit tisztázandó, munkánk célja a ceramid membránhatásainak további vizsgálata, az aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignált érintő esetleges további részletek feltárása, valamint a ceramid újabb „célpontjainak” azonosítása volt.

A ceramidmolekulák a szfingomielinból való felszabadulást követően jellemzően membránhoz kötött állapotban maradnak, így valószínűsíthető, hogy a sokrétű biológiai hatásukat is a membránokra illetve a membránokhoz asszociálódó célmolekulákra kifejtve érik el. Eredményeink szerint a plazmamembránban felhalmozódott ceramid rendkívül gyorsan eléri a T-sejtek intracelluláris membránkompartmentjeit.

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a ceramid jelpálya az src-szerű kinázok (pl. Lck molekula) aktiválása révén gátolni képes a sejt nyugalmi potenciáljának fenntartását biztosító  $\text{K}_v1.3$  típusú  $\text{K}^+$ -csatornák működését (84). Vizsgálataink szerint a ceramid plazmamembránra kifejtett depolarizációs hatása az Lck src kináz hiányában is



megnyilvánul, így a hatás valószínűleg nem a  $K_v1.3$  csatornák aktivitásának ceramidfüggő gátlásával magyarázható. A ceramidcsatornák depolarizációs hatásban játszott szerepének tisztázását célzó kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a ceramidcsatornák képződését gátló  $La^{3+}$  ionok jelenléte csak részben gátolja a ceramidindukált plazmamembrán-depolarizációt. Így valószínűsíthető, hogy a ceramid által okozott membránpotenciál-csökkenés hátterében a ceramidcsatornákon kívül a sejtek ionháztartását befolyásoló egyéb tényezők, mint pl. a ceramid által aktivált  $Cl^-$ -csatornák is szerepet játszhatnak (106).

A ceramidok membránszerkezetre gyakorolt hatásának egyik jellegzetes megnyilvánulása, hogy a membránban ceramidakkumulációt kiváltó bizonyos receptor vagy stressz stimulusok hatására a sejtfelszínen nagyméretű, ceramidban gazdag membránplatformok alakulnak ki. Vizsgálataink szerint a sejtek exogén ceramiddal történő kezelése során szintén megfigyelhető a raftmarker GPI-horgonyzott fehérjék és a GM1 gangliosidok sejtfelszíni aggregátumokba tömörülése, amelyekben érdekes módon a TCR jelátviteli láncai által alkotott CD3 molekulák is feldúsulnak.

A limfocitákon nemrégiben felfedezett  $L$ -típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák aktivációs  $Ca^{2+}$ -szignálban és a limfociták funkciójában játszott szerepe egyelőre még tisztázatlan. Munkánk során a  $Ca_v1.2$   $L$ -típusú  $Ca^{2+}$ -csatornák expresszióját mutattuk ki egér és humán  $T$ -és  $B$ -sejtvonalakban valamint az RBL-2H3 patkány hízósejteken. Az IP12-7 egér  $T_H$ -sejteken és BL41 humán Burkitt limfóma  $B$ -sejteken végzett vizsgálatainkban a csatornák funkcionálisan aktívnak bizonyultak. IP12-7 egér  $T_H$ -sejteken kimutattuk, hogy a  $Ca_v$ -agonista (-)-BayK 8644 által indukált kalciumszignált a ceramidstimulus gátolni képes. A  $T$ -sejtek aktivációs  $Ca^{2+}$ -szignálja kapcsán egy további érdekes megfigyelésünk volt, hogy a ceramid dózisfüggő módon  $Ca^{2+}$ -felszabadulást vált ki a thapsigargin-szenzitív intracelluláris  $Ca^{2+}$ -raktárakból (endoplazmatikus retikulum-ER). Ezek alapján a  $Ca_v1.2$  csatornák és az ER a ceramid-szignálok új, lehetséges célpontjainak tekinthetők. (5., 6., 7. sz. konferencia absztrakt)

Az irodalomban jelenleg egy ellentmondásos kérdés, hogy a ceramid által indukált apoptózis során milyen szerepet töltenek be az iniciátor kaszpázok a mitokondriális membrán permeabilizálódásához vezető folyamatban, illetve hogy a kaszpázaktivitás milyen időbeli összefüggést mutat a mitokondriális membrán permeabilizálódásának kialakulásával. A hosszabb időtartamú, sejthalált indukáló ceramid-szignálok kaszpázkaskádra és az apoptózis mitokondriális útvonálának aktivációjára gyakorolt hatását tekintve megállapíthattuk, hogy az általunk  $T$ -sejt modellként használt IP12-7 sejtekben megközelítőleg azonos időben jelentkezik a mitokondriális depolarizáció illetve a

kaspáz enzimek aktivációja. Ez alapján feltételezhetjük, hogy, a ceramid által indukált apoptózis során a kaspázaktivitás minden bizonnyal a mitokondrium permeabilizálódásának következtében jelenik meg.

A T-sejtek aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálját gátló ceramidstimulusok kapcsán felmerült a kérdés, hogy a nem apoptotikus ceramidszignálok egy általános érvényű, sejtaktivációt szabályozó mechanizmust jelentenek-e más, immunológiai szempontból fontos sejttípus számára is. Vizsgálataink szerint a ceramidszignálokra adott válasz mértékében az immunsejtek típusától és differenciáltsági állapotától függően nagyfokú változatosság tapasztalható. Míg a hosszan tartó, erős ceramidszignálok IP12-7 egér  $T_H$ -sejtekben a programozott sejthalálra jellemző mitokondriális depolarizációt és a DNS-állomány fragmentációját váltottak ki, addig a B-sejtvonalak elsősorban nekrozisra utaló jellegzetességeket mutattak az említett folyamatok megjelenése nélkül. Az éretlen (38C13) és a marginális zóna fenotípusú B-sejtvonalak (X16C) a ceramid által kiváltott sejthalált tekintve fokozott érzékenységet mutattak. Ezzel szemben két vizsgált érett fenotípusú humán eredetű B-limfoma sejtvonal (ST486, BL41) és a hízósejtmodellként használt patkány bazofil leukémia sejtek (RBL-2H3) nagyfokú rezisztenciával jellemezhetők. Az IP12-7 egér  $T_H$ -sejtekhez hasonlóan az éretlen (38C13) és érett (A20) egér B-sejtekben, lép B-sejtekben, és a patkány hízósejtekben (RBL-2H3) a nem-apoptotikus ceramidszignál gátolta az antigénreceptor által indukált kalciumszignált, ugyanakkor az érett humán T- és B-limfoma sejtek (Jurkat, ST486, BL41) a ceramidszignállal szemben ellenállónak bizonyultak. Az érett humán B-limfoma sejtek (ST486, BL41) extrém alacsony lipid raft-expressziója alapján összefüggés feltételezhető a ceramidszignálokkal szembeni rezisztencia és az illető sejttípus lipid raft denzitása között (**3. sz. közlemény**).

Az utóbbi évek kutatási eredményei szerint az ösztrogének fontos hormonális szabályozó faktorként funkcionálnak az adaptív immunválasz kialakulása szempontjából. Az ösztrogének egyrészt a klasszikus intracelluláris receptoraik ( $\text{ER}\alpha$  és  $\beta$ ) révén közvetlenül képesek szabályozni bizonyos gének transzkripcióját, másrészt az intracelluláris jelátviteli pályákat is képesek befolyásolni gyors, transzkripcióhoz csak közvetve vezető ún. nem klasszikus hatásaik révén. Utóbbi hatások közvetítésében fontos szerepet tulajdonítanak a membrán ösztrogénreceptor(ok)nak, amelyek pontos kiléte jelenleg tisztázatlan. Munkánk során az ösztrogén T- és B-limfocitákra kifejtett gyors, nem klasszikus hatásait vizsgáltuk.

Eredményeink szerint a klasszikus intracelluláris ösztrogénreceptorok közül az ER $\alpha$  mutat jelentősebb mértékű expressziót T- és B-sejtekben. A 17 $\beta$ -ösztradiol membránimpermeábilis származékával (E2-BSA) végzett kísérleteink során plazmamembránban lokalizált ösztrogénkötő helyeket sikerült kimutatnunk T- és B-limfocitákban egyaránt. Vizsgálataink alapján az illető membrán ösztrogénreceptorok sejttypusonként eltérő mértékben kolokalizációt mutattak a lipid raftokkal, ugyanakkor semmiképpen nem bizonyultak azonosnak a klasszikus ER $\alpha$  receptorral.

Az ösztrogén intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentrációra gyakorolt hatását tekintve kimutattuk, hogy az ösztrogénnek mind a membránpermeábilis, mind az impermeábilis formája lassú, oszcilláló kalciumválaszt indukál T-sejtekben, B-sejtek esetében azonban nem.

A sejtek számára túlélési szignált biztosító Akt és a ERK1/2 MAP-kinázok foszforilációjára gyakorolt hatás szempontából B-sejtekben a membránpermeábilis ösztrogén dóziszfüggő módon fokozta az említett kinázok foszforilációját. Ugyanakkor T-sejtekben inkább a membránreceptor stimulálása esetén mutatkozott jelentősebb foszforilációt indukáló hatás (*5. sz. közlemény, 10. sz. konferencia absztrakt*).

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az ösztrogén T- és B-sejtekben közvetlen módon, gyors, nem klasszikus hatásokat indukál: B-sejtek esetében elsősorban az intracelluláris ER $\alpha$ -n keresztül, T-sejtekben viszont főképp a membrán ösztrogénreceptorok révén. Mindezen hatások feltehetően fontos szerepet játszanak a T- és B-sejtek homeosztázisában, valamint a T-dependens antigénnel szembeni immunválasz kialakulásában.

## ***Irodalomjegyzék:***

1. Arnold R., Brenner D., Becker M., Frey CR., Krammer PH.: How T lymphocytes switch between life and death. *European Journal of Immunology* 2006; 36:1654-1658
2. Cinque B., Di Marzio L., Centi C., Di Rocco C., Riccardi C., Cifone MG.: Sphingolipids and the immune system. *Pharmacological Research* 2003; 47:421-437
3. Lang TJ.: Estrogen as an immunomodulator, *Clinical Immunology* 2004; 113:224-230
4. Simons K., Ikonen E.: Functional rafts in cell membrane. *Nature* 1997; 387:569-72
5. Pike LJ.: Raft defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 2006;47(7):1597-8
6. Simons K., Vaz WL.: Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2004; 33:269-95
7. London E.: How principles of domain formation in model membranes may explain ambiguities concerning lipid raft formation in cells. *Biochimica et Biophys Acta* 2005;1746:203-20
8. Parton RG., Simons K.: The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):185-94
9. Brown DA., London E.: Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000;275(23):17221-4
10. Parton RG., Richards AA.: Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insight and common mechanisms. *Traffic* 2003;4:724-38
11. Salaun C., James DJ.: Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 2004;5:255-64
12. Manes S., del Real G., Martinez-A C.: Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* 2003;3:557-68
13. Gomez-Mouton C., Lacalle RA., Mira E., Jimenez-Baranda S., Barber DF., Carrera AC., Martinet-A. C., Manes S.: Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J of Cell Biol.* 2004;5:759-68
14. Simons K., Toomre D.: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):31-9
15. Mattson M.: Membrane microdomain signaling: lipid rafts in biology and medicine. 2005 Humana Press
16. Matko J., Szollosi J.: Landing of immune receptors and signal proteins on lipid rafts: a safe way to be spatio- temporally coordinated? *Immunol Lett.* 2002;82:3-15

17. Gombos I., Kiss E., Detre C., László G., Matkó J.:Cholesterol and sphingolipids as lipid organizers of the immune cells' plasma membrane: their impact on the functions of MHC molecules, effector T-lymphocytes and T-cell death. *Immunol Lett.* 2006;104: 59-69
18. Pizzo P., Viola A.:Lymphocyte lipid rafts: structure and fuction. *Curr Opinion in Immunol* 2003;15:255-60
19. Harder T., Engelhardt KR.: Membrane domains in lymphocytes-from lipid rafts to protein scaffolds. *Traffic* 2004;5:265-75
20. Harris J., Werling D., Hope JC., Taylor G.,Howard CJ.:Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. 2002;23(3):158-64
21. Barlage S., Boettcher D.,Boettcher A., Dada A., Schmitz G.:High density lipoprotein modulates platelet function. *Cytometry PartA* 2006;69A:196-99
22. Grandl M., Bared SM., Liebisch G., Werner T., Barlage S.,Schmitz G.: E-LDL and OX-LDL differentially regulate ceramide and cholesterol raft microdomains in human macrophages. *Cytometry PartA* 2006;69A:189-91
23. Ma DW.: Lipid mediators in membrane rafts are important determinants of human health and disease. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;32:341-50
24. Laura Riboni, Paola Viani, Rosaria Bassi, Alessandro Pinetti, Guido Tettamanti: The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog. Lipid Res.* 1997. 36:153-195
25. Hannun YA.: The Sphingomyelin Cycle and the second messenger Function of ceramide. *J of Biol Chem* 1994;269(5):3125-28
26. Hannun YA., Luberto C.: Ceramide in eucaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* 2000; 10:73-80
27. Hannun YA.,Obeid LM.: The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation:stress encounters of lipid kind. *J of Biol Chem* 2002;277:25847-50
28. Levade T.,Jaffrézou JP.: Signalling sphingomyelinase:which, where, how and why? *Biochim et Biophys Acta* 1999;1438:1-17
29. Huwiler A., Kolter T.,Pfilschifter J.,Sandhoff K.: Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim et Biophys Acta* 2000;1485:63-99
30. Gubins E.,Li PL.: Physiological and pathophysical aspect of ceramide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R11-R16
31. Goni FM.,Alonso A.: Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett* 2002;531:38-46

32. Jenkins RW., Canals D., Hannun YA.: Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signalling* 2009; 21:836-46
33. Clark CJ., Snook CF., Tani M., Matmati N., Marchesini N., Hannun YA. *Biochemistry* 2006;45:11247-56
34. Yabu T, Imamura S, Yamashita M, Okazaki T.: Identification of Mg<sup>2+</sup> -dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat stress-induced ceramide generation and apoptosis *J Biol Chem.* 2008 Oct 31;283(44):29971-82
35. Duan RD.: Alkaline sphingomyelinase: An old enzyme with novel implications. *Biochim et Biophys Acta* 2006;1761:281-91
36. Erich Gulbins, Heike Grassmé: Ceramide and cell death receptor clustering *BBA* 2002 1585: 139-145
37. Grassmé H., Jekle A., Riehe A., Schwarz H., Berger J., Sandhoff K., Kolesnick R., Gulbins E.: CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *J of Biol Chem* 2001;276:20589-96
38. Grassmé H., Jendrossek V., Bock J., Riehe A., Gulbins E.: Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J of Immunol* 2002; 168:297-307
39. Rotolo JA., Zhang J., Donepudi M., Lee H., Fuks Z., Kolesnick R.: Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J of Biol Chem* 2005; 280(28):26425-34
40. Zeidan YH., Hannun YA.: Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase C $\delta$ -mediated phosphorylation. *J of Biol Chem* 2007; 282(15):11549-61
41. Zeidan YH., Wu BX., Jenkins RW., Obeid LM., Hannun YA.: A novel role for protein kinase C $\delta$ -mediated phosphorylation of acid sphingomyelinase in UV light-induced mitochondrial injury. *FASEB J.* 2008;22:183-93
42. Krönke M.: Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes *Chemistry and Physics of Lipids* 1999; 101:109-21
43. Segui B., Andrieu-Abadie N., Adam-Klages S., Meilhac O., Kreder D., Garcia V., Bruno AP., Jaffrezou JP., Salvayre R., Krönke M., Levade T.: CD40 signals apoptosis through FAN-regulated activation of the sphingomyelin-ceramide pathway. *J of Biol Chem* 1999; 274(52):37251-58
44. Won JS., Singh I.: Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radical Biology and Medicine* 2006;40:1875-1888
45. Andrieu-Abadie N., Gouazé V., Salvayre R., Levade T.: Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2001;31:717-28

46. Andrieu-Abadie N., Levade T.: Sphingomyelin hydrolysis during apoptosis *Biochim et Biophys Acta* 2002;1585: 126-34
47. Pettus BJ., Chalfant CE., Hannun YA.: Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives *Biochim et Biophys Acta* 2002;1585: 114-125
48. Levy M., Castilloa SS., Goldkorn T.: nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis. *Biochem.Biophys Res Commun* 2006;344: 900-5
49. Goni FM., Alonso A.: Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphinglipids. *Biochim et Biophys Acta* 2006;1758:1902-21
50. Goni FM., Alonso A.: Effects of ceramide and other sphinglipidson membrane lateral structure. *Biochim et Biophys Acta* 2009;1788:169-177
51. Blitterswijk WJ., Van Der Luit A., Veldman R., Verheij M., Brost J.:Ceramide : second mesenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochim J* 2003;369:199-211
52. Ramstedt B., Slotte JP.: Sphinglipids and the formation of sterol-enriched ordered membrane domains. *Biochim et Biophys Acta* 2006;1758:1945-56
53. Contreras FX., Sot J., Ruiz-Arguello MB., Alonso A., Goni FM.: Cholesterol modulation of sphingomyelinase activity at physiological temperatures. *Chem. Lipids* 2004; 130:127-34
54. London E.: Ceramide selectivity displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implication for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* 2004;279:9997-10004
55. Sot J., Ibarguren M., Busto JV., Montes LR., Goni FM., Alonso A.: Cholesterol displacement by ceramide in sphingomyelin-containing liquid-ordered domains, and generation of gel regions in giant lipidic vesicles. *FEBS Lett* 2008;582:3230-3236
56. Cremesti AE., Goni FM., Kolesnick R.: Role of sohingomyelinase and ceramide modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett* 2002; 531:47-53
57. Fanani ML.,Hartel S., Oliveira RG., Maggio B.: Bidirectional control of sphingomyelinase activity and surface topography in lipid monolayers. *Biophysical J* 2002;83:3416-24
58. Ira, Johnston LJ.: Sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes. *Biochim et Biophys Acta* 2008;1778:185-97
59. Grassmé H., Riethmüller J., Gulbins E.,: Biological aspects of ceramide enriched membrane domains. *Progress in Lipid Research* 2007;46:161-170
60. Zhang Y., Li X., Becker KA.,Gulbins E.: Ceramide-enriched membrane domains-Structure and function. *Biochim et Biophys Acta* 2009;1788:178-83

61. Grassmé H., Jekle A., Riehe A., Schwarz H., Berger J., Sandhoff K., Kolesnick R., Gublines E.: CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *J of Biol Chem* 2001;276:20589-96
62. Grassmé H., Schwarz H., Gublines E.: Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:1016-30
63. Cremesti F., Paris F., Grassmé H., Holler N., Tschopp J., Fuks Z., Gublines E.: Ceramide enables fas to cap and kill *J Biol Chem* 2001;276:23954-61
64. S. Parlato, A. M. Giammarioli, M. Logozzi, F. Lozupone, P. Matarrese, F. Luciani, M. Falchi, W. Malorni, S. Fais: CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *The EMBO Journal* 2000;19:5123-5134
65. Giammarioli AM., Garofalo TG., Sorice M., Misiassi R., Gambardella L., Gradini R., Fais S., Pavan A., Malorni W.: GD3 glycosphingolipid contributes to Fas-mediated apoptosis via association with ezrin cytoskeletal protein, *FEBS Letters* 2001;506:45-50
66. Garofalo TG., Misiassi R., Mattei V., Giammarioli AM., Malorni W., Pontieri GM., Pavan A., Sorice M.: Association of the death-inducing signaling complex with microdomains after triggering through CD95/fas. *J Biol Chem* 2003;278:8309-15
67. Siskind LJ., Colombini M.: The lipids C<sub>2</sub>- and C<sub>16</sub>-ceramide form large stable channels *J Biol Chem* 2001;275:28640-44
68. Montes LR., Ruiz-Arguello MB., Goni FM., Alonso A.: Membrane restructuring via ceramide results in enhanced solute efflux. *J Biol Chem* 2002;277:11788-94
69. Siskind LJ., Davoody A., Lewin N., Marshall S., Colombini M.: Enlargement and contracture of C<sub>2</sub>-ceramide channels. *Biophys J* 2003;85:1560-75
70. Anishkin A., Sukharev S., Colombini M.: Searching for the molecular arrangement of transmembrane ceramide channels. *Biophys J* 2006;90:2414-26
71. Siskind LJ., Kolesnick RN., Colombini M.: Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biological Chem* 2002;277:26796-803
72. Siskind LJ., Kolesnick RN., Colombini M.: Ceramide forms channels in mitochondrial outermembranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion* 2006;6:118-25
73. Birbes H., EL Bawab S., Obeid LM., Hannun YA.: Mitochondria and ceramide: intertwined roles in regulation of apoptosis. *Advances in Enzyme Regulation* 2002;42:113-129
74. Marsden VS., Strasser A.: Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:71-105



75. Malisan F., Testi R.: GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim et Biophys Acta* 2002;1585:179-187
76. Siskind LJ.: Mitochondrial ceramide and the induction of apoptosis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2005;37:143-153
77. Yu C., Alterman M., Dobrowsky RT.: Ceramide displaces cholesterol from lipids rafts and decreases the association of the cholesterol binding protein caveolin-1. *J Lipid Res* 2005; 46:1678
78. Chiantia S., Ries J., Chwastek G., Carrer D., Li Z., Bittman R., Schwiller.: Role of ceramide in protein organization investigated by combined AFM and FCS. *Biochim et Biophys Acta* 2008;1778:1356-64
79. Hanada K., Kumagai K., Tomishige N., Kawano M.: CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1771:644-653
80. Ruvolo PP.: Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacological Research*, 2003; 47:383-392
81. Pandey S., Murphy RF., Agrawal DK.:Recent advances in the immunobiology of ceramide. *Experimental and Molecular Pathology*, 2007; 82:298-309
82. Morales A., Lee H., Goni FM., Kolesnick R., Fernandez-Checa J.C.: Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*, 2007; 12:923-939
83. Lepple-Wienhues A., Belka C., Laun T., Jekle A., Walter B., Wieland U., Welz M., Heil L., Kun J., Busch G., Weller M., Bamberg M., Gulbins E., Lang F.: Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. 96:13795-13800
84. Gulbins E., Szabó I., Baltzer K., Lang F.: Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997. 94:7661-7666
85. Bock J., Szabó I., Gamper N., Adams C., Gulbins E.: Ceramide inhibits the potassium channel Kv1.3 by the formation of membrane platforms. *Biochem Biophys Res Comm.* 2003; 305:890-897
86. Whitacre CC.: Sex differences in autoimmune disease. *Nature Immunology* 2001;2:777 - 780
87. Bouman A., Heineman MJ., Faas MM.: Sex hormones and the immun response in humans. *Human Reproduction Update* 2005; 11: 411- 423
88. Beato M., Klug J.:Steroid hormone receptors: an update. *Human Reproduction Update* 2000;6: 225-236
89. Simoncini T., Genazzani AR.: Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol.* 2003; 148: 281-292

90. Norman AW., Mizwicki MT., Norman DPG.: Steroid- hormone rapid action, membrane receptors and conformational ensemble model. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004; 3: 27- 41
91. Moriarty K., Kim KH., Bender JR.:Minireview: Estrogen Receptor- Mediated Rapid Signaling. *Endocrinology* 2006; 147: 5557- 5563
92. Eric R. Prossnitz, Jeffrey B. Arterburn, Larry A. Sklar:GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 138–142
93. Falkenstein E., Tillmann HC., Feuring MCM., Wehling M.:Multiple Actions of Steroid Hormones- A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. *Pharmacological Review* 2000; 52: 513-555
94. Acconcia F., Ascenzi P., Bocedi A., Spisni E., Tomasi V., Trentalance A., Visca P., Marino M.: Palmitoylation- dependent Estrogen Receptor  $\alpha$  Membrane Localization: Regulation by 17 $\beta$ - Estradiol. *Mol Biol Cell*, 2005; 16: 231-237
95. Pedram A., Razandi M., Sainson RC., Kim JK., Hughes CC., Levin ER.: A Conserved Mechanism for Steroid Receptor Translocation to the Plasma Membrane. *J Biol. Chem.* 2007; 282: 22278-22288
96. Pedram A., Mahnaz Razandi, Levin ER.: Nature of Functional Estrogen Receptors at the Plasma Membrane. *Molecular Endocrinology* 2006; 20: 1996-2009
97. Pandey PD., Lappano R., Albanito L., Madeo A., Maggiolini M., Picard D.: Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J.* 2009; 28: 523-532
98. Terasawa E., Noel SD., Keen KL.:Rapid Action of Oestrogen in luteinizing hormone-releasing hormone neurons: The Role of GPR30, *J. Neuroendocrinol* 2009; 1365-2826
99. Noel SD., Keen KL., Baumann DL., Filardo EJ., Terasawa E.: Involvement of G Protein- Coupled Receptor 30 (GPR30) in Rapid Action of Estrogen in Primate LHRH Neurons, *Mol. Endocrinol.* 2009; 23: 349-359
100. Matsuda K., Sakamoto H., Mori H., Hosokawa K.,Kawamura A., Itose M., Nishi M. Prossnitz ER., Kawata M.; Expression and intracellular distribution of the G protein-coupled receptor 30 in rat hippocampal formation. *Neurosci Lett*.2008;441: 94-99
101. Qiu J., Ronnekleiv OK., Kelli MJ.: Modulation of hypothalamic neuronal activity through a novel G- protein- coupled estrogen membrane receptor. *Steroids* 2008; 73: 985-991
102. Windhal SH., Andersson N., Chagin AS., Martersson UE., Carlsten H., Olde B: The role of the G protein- coupled receptor GPR30 in the effects of estrogen in ovariectomized mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296: E490-496

103. Korovkina VP., Brainard AM., Ismail P., Smith TJ., England SK.: Estradiol Binding to Maxi-K channels Induces their down- regulation via proteasomal degradation. *J Biological Chemistry*. 2004; 279: 1217-1223
104. Detre C., Kiss E., Varga Z., Ludányi K., Pászty K., Enyedi Á., Kövesdi D., Panyi Gy., Rajnavölgyi É., Matkó J.: Death or survival: membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration. *Cellular Signalling* 2006, 18: 294-306
105. Pagano RE., Martin OC.: Use of fluorescent analogs of ceramide to study the Golgi apparatus of animal cells. *In Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Julio E. Celis, Editor. Academic Press, 1994, pp. 387-393.
106. Szabó I., Lepple-Wienhues A., Kaba NK., Zoratti M., Gulbins E., Lang F.: Tyrosine kinase-dependent activation of chloride channel in CD95-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, 95:6169-6174
107. Shakor ABA., Kwiatkowska K., Sobota A.: Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *Journal of Biol. Chem.* 2004; 279:36778-36787.
108. Boucher LM., Wiegmann K., Fütterer A., Pfeffer K., Machleidt T., Schütze S., Mak TW., Krönke M.: CD28 signals through acidic sphingomyelinase. *J. Exp. Med.* 1995; 181:2059-2068.
109. Stokes L., Gordon J., Grafton G.: Non-voltage-gated L-type  $\text{Ca}^{2+}$ -channels in human T cells. *Journal of Biol. Chem.* 2004; 279:19566-19573.
110. Kotturi MF., Jefferies WA.: Molecular characterization of L-type calcium channel splice variants expressed in human T lymphocytes. *Molecular Immunology*, 2005; 42:1461-1474.
111. Badou A., Basavappa S., Desai R., Peng YQ., Matza D., Mehal WZ., Kaczmarek LK., Boulpaep EL., Flavell RA.: Requirement of voltage-gated calcium channel  $\beta 4$  subunit for T lymphocyte functions. *Science*, 2005; 307:117-121.
112. Grafton G., Stokes L., Toellner KM., Gordon J.: A non-voltage-gated calcium channel with L-type characteristics activated by B cell receptor ligation. *Biochemical pharmacology*, 2003; 66:2001-2009.
113. Savignac M., Badou A., Moreau M., Leclerc C., Guery JC., Paulet P., Druet P., Ragab-Thomas J., Pelletier L.: Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor-coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *FASEB J.* 2001; 15:1577-1579.
114. Kotturi MF., Hunt SV., Jefferies WA.: Roles of CRAC and Cav-like channels in T cells: more than one gatekeeper? *Trends in Pharmacological Sciences*, 2006; 27:360-367.

115. Chik CL., Li B., Karpinski E., Ho AK.: Ceramide inhibits L-type calcium channel currents in GH<sub>3</sub> cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004; 218:175-183
116. Ospina NG., Tsuruta F., Barreto-Chang O., Hu L., Dolmetsch R.: The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca<sub>v</sub>1.2 encodes a transcription factor. *Cell*, 2006; 127:591-606.
117. Ricci JE., Gottlieb RA., Green DR.: Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 2003.; 160:65-75
118. Susin SA., Zamzami N., Catedo M., Daugas E., Wang HG., Geley S., Fassy F., Reed JC., Kroemer G.: The central executioner of apoptosis: multiple connections between protease activation and mitochondria in Fas/APO-1/CD95- and ceramide-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 1997; 186:25-37
119. Scaffidi C., Shmitz I., Zha J., Korsmeyer SJ., Krammer PH., Peter ME.: Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *Journal of Biol. Chem.* 1999; 274:22532-22538.
120. Lin CF., Chen CL., Chang WT., Jan MS., HsuLJ., Wu RH., Tang MJ., Chang WC., Lin YS.: Sequential caspase-2 and caspase-8 activation upstream of mitochondria during ceramide- and etoposide-induced apoptosis. *Journal of Biol. Chem.* 2004; 279:40755-40761
121. Thon L., Möhlig H., Mathieu S., Lange A., Bulanova E., Winoto-Morbach S., Shütze S., Bulfone-Baus S., Adam D.: Ceramide mediates caspase independent programmed cell death. *FASEB J.*, 2005; 19:1945-1956
122. Thomas, W., Coen N., Faherty S., Flatharta CO., Harvey BJ.: Estrogen induces phospholipase A2 activation through ERK1/2 to mobilize intracellular calcium in MCF-7 cells. *Steroids* , 2006; 71:256-265.
123. Peter W., Benten M., Liebherr M., Giese G., Wunderlich F.: Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells, *FEBS Letters*, 1998; 422: 349-353
124. Peter W., Benten M., Stephan C., Wunderlich F.: B cell express intracellular but not surface receptor for testosterone and estradiol, *Steroids*, 2002; 67: 647-654
125. Adam D., Heinrich M., Kabelitz D., Schütze S.: Ceramide: does it matter for T cells? *Trends in Immunology* 2002. 23:1-4

## Összefoglalás

A szfingomielinázok aktivációja a sejteket érő számos stressz stimulus esetén megfigyelt jelenség, amely egy sokrétű intracelluláris jeltávíteli mediátor molekula, a ceramid képződéséhez vezet. A T-sejtek esetén a ceramid szabályozó funkcióinak számos oldalát sikerült már megismerni, mint pl. néhány korai, a membrán szerkezetére gyakorolt hatása, a sejtciklus, vagy a proliferáció szabályozása. A ceramid ugyanakkor a mitokondriumon keresztül lezajló, ún. foszfolipid sejthalál jelpályának is fontos eleme. A ceramidok membránszerkezetre gyakorolt hatásának egyik jellegzetes megnyilvánulása, hogy a membránban ceramidakkumulációt kiváltó stimulusok hatására a sejtfelületen nagyméretű, ceramidban gazdag membránplatformok alakulnak ki. Vizsgálataink szerint a sejtek exogén ceramiddal történő kezelése során szintén megfigyelhető a raftmarker GPI-horgonyzott fehérjék és a GM1 gangliozidok sejtfelületi aggregátumokba tömörülése, amelyekben érdekes módon a TCR jeltávíteli láncai által alkotott CD3 molekula is feldúsul. Munkánk során  $\text{Ca}_v1.2$  L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák expresszióját mutattuk ki egér és humán T- és B-sejtvonalakban valamint RBL-2H3 patkány hízósejteken. Az IP12-7 egér  $\text{T}_\text{H}$ -sejteken és BL41 humán Burkitt limfóma B-sejteken végzett vizsgálataink szerint a csatornák funkcionálisan aktívak. IP12-7 egér  $\text{T}_\text{H}$ -sejteken a  $\text{Ca}_v$ -agonista (-)-Bay K 8644 által indukált kalciumszignál ceramidra érzékenynek bizonyult. A T-sejtek kapcsán megfigyeltük, hogy a ceramid dóziszfüggő módon  $\text{Ca}^{2+}$ -felszabadulást képes kiváltani a thapsigargin-szenzitív intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárakból (endoplazmatikus retikulum-ER). A sejthalált indukáló ceramid-szignáloknak az apoptózis mitokondriális útvonalára gyakorolt hatását tekintve megállapíthattuk, hogy az IP12-7 T-sejtekben megközelítőleg azonos időben jelentkezik a mitokondriális depolarizáció illetve a kaspáz enzimek aktivációja. A ceramid aktivációs  $\text{Ca}^{2+}$ -szignálra gyakorolt valamint sejthalált indukáló hatása tekintetében az érintett sejtek differenciáltsági állapotától és típusától függő eltéréseket tapasztaltunk. A hosszantartó, erős ceramidszignálok IP12-7 egér  $\text{T}_\text{H}$ -sejtekben a programozott sejthalálra jellemző mitokondriális depolarizációt és a DNS-állomány fragmentációját váltottak ki, addig a B-sejtvonalak elsősorban nekrozisra utaló jellegzetességeket mutattak az említett folyamatok megjelenése nélkül. Az éretlen (38C13) és a marginális zóna fenotípusú B-sejtvonalak (X16C) a ceramid által kiváltott sejthalált tekintve fokozott érzékenységet mutattak. Ezzel szemben két vizsgált érett fenotípusú humán eredetű B-limfóma sejtvonal (ST486, BL41) és a hízósejtemellként használt patkány bazofil leukémia sejtek (RBL-2H3) nagyfokú rezisztenciával jellemezhetők.

Az utóbbi évek kutatási eredményei szerint az ösztrogének fontos szabályozó faktorok az adaptív immunválasz kialakulása szempontjából. Az ösztrogének a klasszikus intracelluláris receptoraiakon ( $\text{ER}\alpha$  és  $\beta$ ) illetve membránreceptoraiakon keresztül fejthetik ki hatásukat. Munkánk során az ösztrogén T- és B-limfocitákra kifejtett gyors, nem klasszikus hatásait vizsgáltuk. Eredményeink szerint a klasszikus intracelluláris ösztrogénreceptorok közül az  $\text{ER}\alpha$  mutat jelentősebb mértékű expressziót T- és B-sejtekben. A 17 $\beta$ -ösztradiol membránimpermeábilis származékával (E2-BSA) végzett kísérleteink során plazmamembránban lokalizált ösztrogénkötő helyeket sikerült kimutatnunk T- és B-limfocitákban egyaránt, amelyek kolokalizációt mutattak a lipid raftokkal, ugyanakkor nem bizonyultak azonosnak a klasszikus  $\text{ER}\alpha$  receptorral. Az ösztrogénnek mind a membránimpermeábilis, mind az impermeábilis formája lassú, oszcilláló kalciumválaszt indukál T-sejtekben, B-sejtek esetében viszont nem. Az Akt és a ERK1/2 MAP-kinázok foszforilációjára gyakorolt hatás szempontjából B-sejtekben a membránimpermeábilis ösztrogén dóziszfüggő módon fokozta az említett kinázok foszforilációját. Ugyanakkor T-sejtekben inkább a membránreceptor stimulálása esetén mutatkozott jelentősebb foszforilációt indukáló hatás.

## Summary

Activation of sphingomyelinases through death- and stress stimuli induce plasma membrane ceramide (CER) generation, which is an important mediator/regulator of various lymphocyte responses, including cell death, differentiation or proliferation. Recently, we have shown that T-cells' fate depends on the strength and duration of CER-accumulation in their membrane. Below a certain threshold, the ceramide signal suppressed the antigen specific T-cell activation. The present work aimed at identifying CER's membrane restructuring effects and its targets involved in modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, analyzing the cell type dependence of its effects on  $\text{Ca}^{2+}$  signalling and cell death induction.

Functionally active L-type  $\text{Ca}_v1.2$   $\text{Ca}^{2+}$ -channels were identified in murine and human T- and B-lymphocytes, as well as in mast cells. The subapoptotic CER stimuli reduced the calcium response induced by  $\text{Ca}_v$  agonist (-)Bay K 8644 in mouse  $\text{T}_\text{H}$ -cells. CER also induced a rapid, dose-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -release from a thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  pool (ER). These data suggest that  $\text{Ca}_v1.2$  channels and the ER pool are two new potential CER-targets. The ceramide-mediated inhibitory effects on calcium signalling and its cell death-inducing effects are highly cell type/maturation status-dependent. While the inhibitory  $\text{Ca}^{2+}$ -signal modulation of CER operated also in immature (38C13), mature (A20) murine B-lymphocytes and rat mast cells (RBL-2H3), the mature human B lymphoma cell lines (BL41 and ST486) proved to be resistant to CER. Similar cell type dependence was observed regarding CER's death-inducing capability. All these data, together its membrane reorganizing effects suggest that CER has a multiple target action on the lymphocyte signalling pathways, including membrane-linked effects and effects on the phosphorylation-dephosphorylation balance.

Sex steroid-mediated modulation of immune response is one of the issues being extensively investigated recently. However, the strict mechanism of the regulation is still not understood. Formerly, we observed that estrogen has a positive regulatory role in T - dependent, but not in T-independent immune response. Estrogen can exert its effects on T- and B cells through either its intracellular receptors ( $\text{ER}\alpha$ ,  $\text{Er}\beta$ ) by directly activating gene transcription or through rapid, non genomic effects activating several intracellular signalling pathways. Our aim was to study these latter processes in isolated murine splenic T and B cells and also in T- and B cell lines.

*In vitro* studies revealed that  $\text{ER}\alpha$  is expressed both in B and T cells. Moreover, based on experiments using membrane impermeable E2 conjugated to BSA, we have shown that the membrane receptor of estrogen also exists in both cell types. These membrane receptor sites are colocalized with lipid rafts, and did not show any overlapping with  $\text{ER}\alpha$ 's intracellular localization. As an early activation signal, we detected a significant increase of intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$  in T but not in B cells upon E2 treatment. As for the activation of kinases mediating proliferative and survival signals, E2 induced the phosphorylation of Akt and ERK1/2 in B cells. In conclusion, estrogen may directly regulate the survival of B cells, and thus autoreactive B cell clones, and may enhance immune response to TD antigen through its act on  $\text{T}_\text{H}2$  cells.

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdei Annának, hogy lehetővé tette számomra a tanszéken folyó kutatómunkába való bekapcsolódást.

Külön köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Matkó Jánosnak e számomra is rendkívül érdekes téma felvetéséért, a számtalan kísérleti módszer megismertetéséért, és nélkülözhetetlen szakmai tanácsaiért.

Köszönöm a tanszék valamennyi dolgozójának segítőkészségét és a tanszékre jellemző remek légkört, melyben dolgozhattam.

Külön köszönöm *Családomnak és Kedvesemnek*, hogy céljaim elérésében feltétel nélkül, rengeteg türelemmel és szeretettel segítettek.

## Saját közlemények jegyzéke

### Az értekezés témájában megjelent saját közlemények:

- 1.) Cynthia Detre, Endre Kiss, Zoltán Varga, Katalin Ludányi, Katalin Pászty, Ágnes Enyedi, Dorottya Kövesdi, György Panyi, Éva Rajnavölgyi, János Matkó: „Death or survival: membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration.”  
*Cellular Signalling* 2006. 18: 294-306 impakt faktor: **4,887**
- 2.) Imre Gombos, Endre Kiss, Cynthia Detre, Glória László, János Matkó: „Cholesterol and sphingolipids as lipid organizers of the immune cells' plasma membrane: their impact on the functions of MHC molecules, effector T-lymphocytes and T-cell death.”  
*Immunology Letters* 2006. 104: 59-69 impakt faktor: **2,136**
- 3.) Endre Kiss, Gabriella Sármay, János Matkó: „Ceramide-modulation of antigen-triggered  $Ca^{2+}$ -signals and cell fate: diversity in the responses of various immunocytes.”  
*Annals of the New York Academy of Sciences* 2006. 1090: 161-167  
impakt faktor: **1,930**
- 4.) Endre Kiss, Péter Nagy, Andrea Balogh, János Szöllösi, János Matkó: „Cytometry of raft and caveola membrane microdomains: from flow and imaging techniques to high throughput screening.”  
*Cytometry Part A* 2008. 73A: 599-614 impakt faktor: **2,978**
- 5.) Mónika Ádori\*, Endre Kiss\*, Zsuzsanna Barad, Klaudia Barabás, Edda Kiszely, Andrea, Schneider, Erna Sziksz, Dorottya Kövesdi, István M. Ábrahám, János Matkó, Gabriella Sármay: „Estrogen augments the T-cell-dependent but not the T-independent immune response *in vivo* and induces rapid non-classical effects on B- and T-cells.”  
*Journal of Immunology* 2009. (*bíralatra elküldve*)  
(\* megosztott elsőszereplőség)

### Egyéb közlemények:

- 1.) Dorottya Kövesdi, Katalin Pászty, Ágnes Enyedi, Endre Kiss, János Matkó, Katalin Ludányi, Éva Rajnavölgyi, Gabriella Sármay: „Antigen receptor-mediated signaling pathways in transitional immature B cells.”  
*Cellular Signalling* 2004. 16: 881-889 impakt faktor: **4,741**
- 2.) Tárnok, K., Kiss, E., Luiten, P.G.M., Nyakas, Cs., Tihanyi, K., Schlett, K., Eisel, U.L.M.: “Effects of Vinpocetine on mitochondrial function and neuroprotection in primary cortical neurons.”  
*Neurochemistry International* 2008. 53(6-8): 289-95 impakt faktor: **2,975**



### **Publikált absztraktok:**

Cynthia Detre, Endre Kiss, Zoltán Varga, Katalin Ludányi, Katalin Pászty, Ágnes Enyedi, György Panyi, Éva Rajnavölgyi, János Matkó: „Dual face of ceramide: non-apoptotic Cer-stimuli modulate antigen-specific T-cell activation through blocking plasma membrane ion channels.” 30<sup>th</sup> FEBS Congress and 9<sup>th</sup> IUBMB Conference (Budapest, 2005) *The FEBS Journal*, July 2005, Vol. 272 (Suppl. 1):193

### **Konferencia absztraktok:**

- 1.) Detre Cynthia, Kiss Endre, Ludányi Katalin, Pászty Katalin, Enyedi Ágnes, Réthi Bence, Rajnavölgyi Éva, Matkó János: „Membrane ceramide release may control the sensitive balance of activation, survival and death signals in T-cells: implications in rescuing AICD.” 12<sup>th</sup> Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System (Sopron, 2003)
- 2.) Roland K. Csépanyi, Endre Kiss, Helga Látos, Barbara Uzonyi, Emese Kemény, Leonora Himer, Glória László, János Matkó: „Relationship between macrophage phenotypes and their antigen presenting or phagocytic capacity. Both functions are cholesterol/lipid raft-dependent.” 13<sup>th</sup> Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System (Balatonöszöd, 2005)
- 3.) Endre Kiss, Gabriella Sármay, János Matkó: „Ceramide-modulation of antigen-triggered Ca<sup>2+</sup>-signals and cell fate: a diversity in the responses by different lymphoid and myeloid cells.” Cell Signaling World Congress (Luxembourg, 2006)
- 4.) Attila Kolonics, Tünde Horváth, Endre Kiss, János Matkó, Enikő Kulcsár, Péter Literáti-Nagy, Botond Literáti-Nagy, Kitti Barta, László Korányi, Kálmán Tory: „Mitochondrial status of lymphocytes shows correlation with metabolic state.” American Diabetes Association, 66<sup>th</sup> Scientific Sessions (Washington, DC, USA, 2006)
- 5.) Endre Kiss, Cynthia Detre, Dávid Medgyesi, Gabriella Sármay, János Matkó: „Controlling the life and death balance in lymphocytes: role of ceramides and FcγRIIB.” 1<sup>st</sup> Joint Meeting of European National Societies of Immunology Under the auspices of EFIS (Párizs, Franciaország, 2006)
- 6.) Endre Kiss, Cynthia Detre, János Matkó: „Complexity of ceramide signals and their impact on life or death of lymphocytes: complex fluorescence flow- and image cytometric analysis.” 10<sup>th</sup> Conference on Methods and Applications of Fluorescence (Salzburg, Ausztria, 2007)
- 7.) Endre Kiss, Cynthia Detre, György Panyi, János Matkó: „Ceramide modulates lymphocyte signalling: searching for targets and the mechanism of action.” 14<sup>th</sup> Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System (Balatonöszöd, 2007)

- 8.) Regina Tugyi, Katalin Jemnitz, Zsuzsa Veres, Endre Kiss, László Vereczkey: „The effects of different drugs on hepatobiliary transporter MRP2 as studied by fluorimetric methods in sandwich hepatocyte culture.” 10<sup>th</sup> European ISSX Meeting (Bécs, Ausztria, 2008)
- 9.) A. Kolonics, A. Cselenyak, E. Kiss, P.N. Literati, K. Tory: „A new type of insulin sensitizer, BGP-15 regulates mitochondrial function.” 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, (Róma, Olaszország, 2008)
- 10.) E. Kiss, M. Ádori, Zs. Barad, K. Barabás, E. Kiszely, A. Schneider, D. Kövesdi, I. Ábrahám<sup>2,4</sup>, G. Sármay<sup>1,3</sup>, J. Matkó: „Estrogen regulates T-dependent humoral immune response and exerts rapid, non-genomic effects on B- and T lymphocytes.” 15<sup>th</sup> Symposium on Signals and Signal Processing in the Immune System (Balatonöszöd, 2009)